

Aus dem Fachbereich Hämostaseologie und Angiologie
der Deutschen Klinik für Diagnostik
Wiesbaden

„Entwicklung und Anwendung eines Testes zum klinischen Monitoring einer Therapie
mit rFVIIa bei thrombozytären Gerinnungsstörungen“

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Wolfgang Wegert
aus Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2008

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent: PD Dr. C. M. Kirchmaier
Koreferent: Prof. Dr. G. Kauert
Tag der mündlichen Prüfung: 08.07.2009

Einleitung

1. Grundlagen der Hämostase	1
1.1. Initiation der plasmatischen Gerinnung - Die Rolle von Tissue Factor (TF) und FVIIa	2
1.2. Ablauf der Gerinnung – Thrombinbildung	3
2. Rekombinanter FVIIa	3
2.1. Struktur	3
2.1.1. Gamma- (g-) Carboxylierung	4
2.1.2. Beta- (b-) Hydroxylierung	4
2.1.3. O-Glykosylierung	4
2.1.4. N-Glykosylierung	6
2.1.5. Struktur-Funktionsbeziehungen von FVIIa	6
2.1.6. rFVIIa – NovoSeven®	7
2.2. Herstellung von rFVIIa	8
2.2.1. Expression	8
2.2.2. Aktivierung von FVII zu FVIIa	9
2.2.3. Aufreinigung	10
2.3. Pharmakodynamik	10
2.4. Pharmakokinetik in Patienten	11
2.4.1. Klinische Anwendung und zugelassene Indikationen	11
2.4.2. Hemmkörper-Hämophilie A und B	11
2.4.3. Faktor VII-Mangel	12
2.4.4. Thrombasthenie Glanzmann (TG)	12
2.5. Dosis, Dosierungsbereich und Behandlungsintervalle	12
2.5.1. Hämophilie A oder B mit Hemmkörpern oder erworbene Hämophilie	12
2.5.2. Thrombasthenie Glanzmann (TG)	13
2.5.3. Faktor VII-Mangel	14

2.6. Sicherheit bei klinischer Anwendung von rFVIIa	14
2.6.1. Nebenwirkungen	14
2.6.2. Studien	15
2.7. Thrombozytenfunktionsstörungen	15
2.7.1. Thrombasthenie Glanzmann	16
3. Der Thrombinbildungstest – eine Methode zur Charakterisierung der Gerinnungsaktivität von Plasma unter Therapie mit N7	16
4. Zielsetzung der Arbeit	19

Methoden

1. Plasmapräparation	
1.1. Präparation des plättchenreichen Plasmas (PRP)	20
1.2. Präparation des plättchenarmen Plasmas (PRP)	20
2. Der Thrombinbildungstest in plättchenreichem Plasma – eine weiterentwickelte Methode zur Charakterisierung der Gerinnungsaktivität von Plasma unter Beteiligung der Thrombozyten (thrombin generation test oder TGT)	20
2.1. Messung der Thrombinaktivität	21
2.2. Aktives, inaktives, freies und gebundenes Thrombin - die α_2 -Makroglobulin (α_2 M)-Korrektur	21
2.3. Ablauf der Messung	21
2.4. Auswertung der TGT-Meßdaten	23
2.4.1. ETP	23
2.4.2. PEAK	24
2.4.3. TIME TO PEAK	24
2.4.4. LAG TIME	24

3. Durchflusszytometrie und FACS	26
3.1. Durchflusszytometrie	26
3.2. Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS)	27
3.3. Geräteaufbau	28
3.4. Durchflusszytometrische Messung (FACS) von Thrombozyten	30
3.5. Durchführung der FACS-Messungen	30
3.5.1. Aktivierter Fibrinogenrezeptor (PAC1)	31
3.5.2. Fibrinogen-Bindungskapazität und P-Selektin (CD62P-Antigen) unter TRAP und ADP-Stimulation	31
3.5.3. Annexin V und P-Selektin (CD62P) unter N7-Stimulation	32

Ergebnisse

1. Dosis-Wirkungskurven für die Thrombingenerierung unter rFVIIa bei gesunden Normalpersonen	33
1.1. Endogenes Thrombinpotential (ETP)	33
a) In-vitro-Inkubation (Spiking) von PRP mit rFVIIa	33
b) Die Veränderung des ETP des Probandenkollektivs unter rFVIIa in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)	35
1.2. Maximale Thrombinbildungsgeschwindigkeit (PEAK)	36
a) Spiking von PRP mit rFVIIa, Thrombinbildung, maximale Bildungsgeschwindigkeit (PEAK)	36
b) Die Veränderung des PEAK des Probandenkollektivs unter rFVIIa in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)	37
1.3. Latenzphase oder LAG TIME (LT)	
a) Spiking von PRP mit rFVIIa, Thrombinbildung	38
b) Die Veränderung der LT unter rFVIIa in Minuten	39

1.4. TIME TO PEAK (TTP)	
a) Spiking von PRP mit rFVIIa, Thrombinbildung	40
b) Die Veränderung der TTP unter rFVIIa in Minuten	41
2. Einfluss des TF-neutralisierenden Antikörpers (TF-Ab) auf die rFVIIa-abhängige Thrombingenerierung	42
a) ETP-Veränderungen unter rFVIIa in Gegenwart eines TF-neutralisierenden Antikörpers in RFU	43
b) PEAK-Veränderungen unter rFVIIa in Gegenwart eines TF-neutralisierenden Antikörpers in RFU/min	44
c) LT-Veränderungen unter rFVIIa in Gegenwart eines TF-neutralisierenden Antikörpers in Minuten	45
d) TTP-Veränderungen unter rFVIIa in Gegenwart eines TF-neutralisierenden Antikörpers in Minuten	46
3. Der Einfluß von Trypsin-Inhibitor aus Mais (corn trypsin inhibitor, CTI) auf die Thrombinbildung unter rFVIIa	47
4. Weitere klinische Untersuchungen unter Einschluss von Patienten mit Thrombozytenfunktionsstörungen	48
4.1. Familie T. - Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann (GT)	49
a) Thrombasthenie-Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten; Thrombinbildung (TGT); Endogenes Thrombinpotential (ETP)	49
b) Thrombasthenie-Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten; TGT; PEAK	50
c) Thrombasthenie-Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten; Thrombinbildung; Lag Time (LT)	51
d) Thrombasthenie-Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten; Thrombinbildung; TIME TO PEAK	52

4.1.1. Thrombinbildung bei Thrombasthenie Glanzmann	
-betroffener Familie, Einzelprofilardarstellung	52
a) Thrombasthenie Glanzmann-betroffene Familie	
mit 5 Patienten; TGT-Einzelprofile mit Mediankurve,	
Endogenes Thrombinpotential (ETP)	53
b) Thrombasthenie Glanzmann-betroffene Familie	
mit 5 Patienten; TGT; Einzelprofile mit Mediankurve; PEAK	54
c) Thrombasthenie Glanzmann-betroffene Familie	
mit 5 Patienten; TGT Einzelprofile mit Median,	
Lag Time (LT)	55
d) Thrombasthenie Glanzmann-betroffene Familie	
mit 5 Patienten; TGT-Einzelprofile mit Median,	
TIME TO PEAK	56
4.1.2. Thrombasthenie Glanzmann-betroffene Familie mit	
5 Patienten, Durchflusszytometrie (FACS) vor und	
nach Gabe von rFVIIa	57
a) rFVIIa (zusätzlich in-vitro)-aktivierte thrombozytäre	
Annexin V-Bindung	57
b) ADP-aktivierte Plättchen-Fibrinogenbindung	58
c) TRAP-aktivierte Plättchen-Fibrinogenbindung	59
d) TRAP-aktivierte thrombozytäre CD62-Expression	60
e) ADP-aktivierte thrombozytäre CD62-Expression	61
4.2. Patient EG - Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann (GT)	62
4.2.1. Patient EG, Durchflusszytometrie (FACS) vor und	
nach Gabe von rFVIIa	63
a) TRAP-aktivierte Plättchen-Fibrinogenbindung	63
b) ADP-aktivierte Plättchen-Fibrinogenbindung	63
c) TRAP-aktivierte thrombozytäre CD62-Expression	64
d) ADP-aktivierte thrombozytäre CD62-Expression	65
e) rFVIIa (zusätzlich in-vitro)-aktivierte thrombozytäre	
CD62-Expression	65

f) ADP- und TRAP-aktivierte thrombozytäre PAC1-Expression	66
g) rFVIIa (zusätzlich in-vitro)-aktivierte thrombozytäre Annexin-V-Bindung	66
4.2.2. Patient EG, Thrombingenerierung vor und nach rFVIIa-Bolusgabe	67
a) Patient EG, Thrombingenerierung, Endogenes Thrombinpotential (ETP)	67
b) Patient EG, Thrombingenerierung, maximale Thrombinbildungsrate (PEAK)	68
c) Patient EG, Thrombingenerierung, Lag Time	69
d) Patient EG, Thrombingenerierung, TIME TO PEAK	69
Diskussion	71
Zusammenfassung	90
Summary	92
Materialien	94
Literatur	97
Danksagung	115

massiven Freisetzung verschiedener Mediatoren aus den verschiedenen Plättchenorganellen, wie zum Beispiel Calciumionen, Faktor V (FV), Thromboxan A₂, Plättchenfaktor-4, Serotonin, Fibrinogen oder Fibronectin. Weitere Plättchen adhären über von-Willebrand-Faktor (vWF) oder den Plättchenrezeptor GPIIb/IIIa an der Gefäßwand, es kommt zur Ausbildung eines lockeren Thrombozytenpfropfes. In der Folge durchlaufen die Plättchen eine Reihe biochemischer und morphologischer Veränderungen, die als Aktivierung bezeichnet werden. Im Laufe dieses Prozesses werden verstärkt negativ geladene Phospholipide auf der Membranoberfläche der Thrombozyten präsentiert. Dadurch wird, durch Calciumionen und Phospholipide vermittelt, die Anlagerung mit positiven und negativen Teilladungen versehenen Gerinnungsfaktoren aus dem Blutfluss ermöglicht und der Thrombozytenpfropf durch Fibrinbildung und -vernetzung stabilisiert.

1.1. Initiation der plasmatischen Gerinnung - Die Rolle von Tissue Factor (TF) und FVIIa

Durch den Endotheldefekt kommen die plasmatischen Gerinnungsfaktoren in Kontakt mit extravaskulärem TF. Dieser wird vom Endothel gebildet und ist vom Blutstrom getrennt lokalisiert. TF ist auch bekannt als CD142, Gewebsthromboplastin oder Faktor III und der potenteste Aktivator des Gerinnungssystems (sog. extrinsische Gerinnungsaktivierung). Im Rahmen der TF-induzierten Gerinnungsaktivierung auf der Oberfläche aktivierter Plättchen wird Thrombin (Faktor IIa) aus seinem inaktiven Zymogen Prothrombin (Faktor II) generiert. Entscheidend bei diesem Vorgang ist die Bildung eines Gerinnungsfaktorkomplexes aus TF und FVIIa. Durch diesen Komplex werden die Faktoren IX und X zu IXa und Xa aktiviert, welche zur Bildung des Tenase- (VIIIa und IXa) und Prothrombinasekomplexes (Xa und Va) benötigt werden [4]. Dabei fungiert der TF/VIIa-Komplex als eine Art "Zündkerze", die an der Stelle der Gefäßverletzung schnell aktiv wird. Der "Zündfunken" kann daher durch die Gabe von FVIIa, hier: humaner rFVIIa, NovoSeven[®], erzeugt, beschleunigt und verstärkt werden.

Thrombozyten können selbst keinen TF bilden und sind daher nicht in der Lage, selbst den Ablauf der Gerinnungskaskade zu starten [118]. Sie enthalten aber eine inaktive Form des TF, wahrscheinlich aus leukozytärer Quelle, der Aktivität

entwickeln kann, nachdem er von den Thrombozyten nach agonistischer Stimulation an der Oberfläche präsentiert oder sezerniert wurde [5].

1.2. Ablauf der Gerinnung – Thrombinbildung

Die Generierung von Thrombin kann in zwei Phasen unterteilt werden: Erstens, eine Initiationsphase, in der nanomolare Konzentrationen von Prothrombin und picomolare Konzentrationen anderer Gerinnungsfaktoren, aktiviert werden. Das gebildete Thrombin der Initiationsphase aktiviert Thrombozyten und verändert so die Verteilung und das Arrangement der Membranlipide, die damit zu Anker- und Sammelplätzen der Gerinnungsfaktorkomplexe werden [106, 215]. Zweitens, die Propagationsphase, eine Amplifikationsphase mit schnell zunehmender Thrombinbildung nach Beginn der Gerinnungsbildung, die sich besonders durch die Erzeugung von Va und VIIa selbst verstärkt [106], gleichzeitig aber durch die Aktivierung von Protein C ihre Termination einleitet [6].

2. Rekombinanter FVIIa

2.1. Struktur

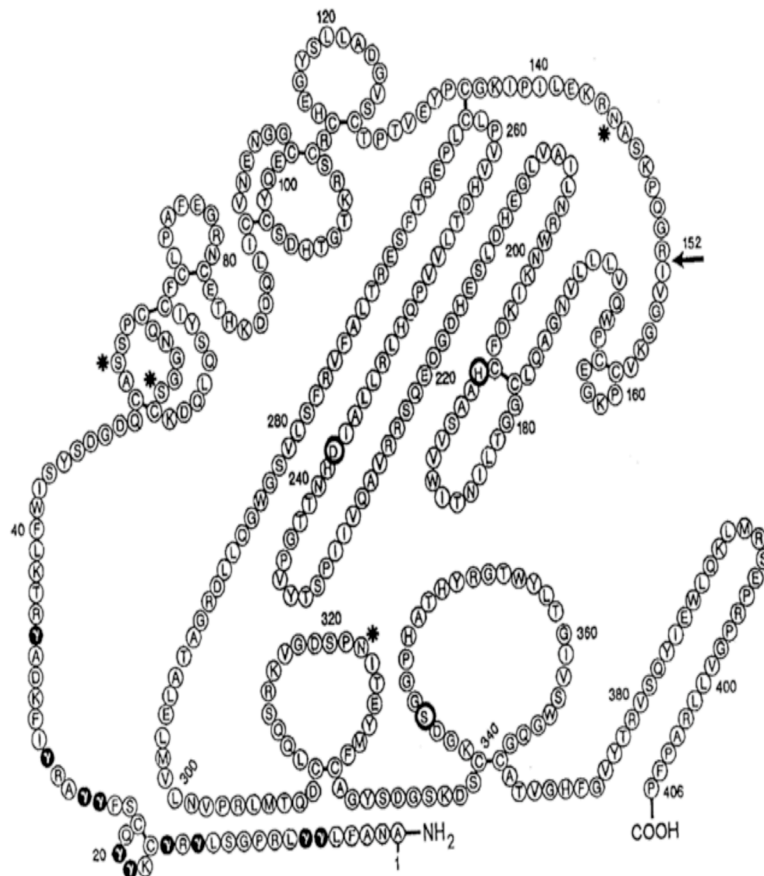
Menschlicher plasmatischer (pd)FVIIa und rekombinanter (r)FVIIa wurden anhand ihrer Sequenz verglichen, in eine leichte und die schwere Kette getrennt und einer Peptid-Sequenz-Kartierung unterzogen. Dieser Vergleich zeigt, dass die Moleküle eine identische Aminosäureabfolge aufweisen [17]. Humaner, aus Plasma gewonnener FVIIa (pdFVIIa) zirkuliert im Blut als einkettiges Zymogen mit 406 Aminosäuren. Er besteht aus vier verschiedenen Domänen: Einer N-terminalen γ -Carboxyglutamat(Gla)-Domäne, zwei Epidermaler-Wachstumsfaktor (EGF)-ähnlichen Domänen und einer Serinproteasedomäne.

Das aktive, aus zwei Ketten bestehende Enzym wird durch spezifische Spaltung nach Arg152 erzeugt (Fig. E2) [8]. Der primäre Synthesort und posttranslationaler Modifikationsort von pdFVII ist die Leber, wo auch die posttranslationalen Modifikationen (s. Fig. E2) durchgeführt werden.

Fig. E2: Humaner Gerinnungs-
faktor VII (FVII). FVIIa ist eine
Serinprotease mit 406 Amino-
säuren. Das aktive Enzym besteht
aus zwei Ketten, erzeugt durch
Spaltung nach Arg152. Post-
translationale Modifikationen des
Moleküls beinhalten:

- (1) g-Carboxylierung von
10x Glutamat im N-
terminalen Teil,
- (2) N-Glykosylierung
Asn145 und Asn322,
- (3) O-Glykosylierung von
Ser52 und Ser60.

Positionen im Sequenzdiagramm:
g, Gamma-Carboxyglutamat;
*, Glykosylierungsposition;
←, Aktivierungsschnittstelle;
O, Positionen im katalytischen
Zentrum.



Die Charakterisierung der Struktur von rFVIIa beinhaltet die Bestimmung der Aminosäuresequenz und der potentiellen posttranslationalen Modifikationen, welche beide bereits untersucht und verglichen wurden [17]. Die enzymatischen Eigenschaften von pdFVIIa und rFVIIa wurden evaluiert und für gleichwertig befunden [18].

2.1.1. Gamma-(g-)Carboxylierung

Der Gehalt an g-carboxyliertem Glutamat (Gla) in rFVIIa wurde mit dem von humanem pdFVIIa verglichen [17]. In humanem pdFVIIa sind alle 10 möglichen Gla-Positionen (Fig. [E2]) g-carboxyliert, wohingegen rFVIIa neun stets g-carboxylierte Positionen und eine partiell (ca. 50%) g-carboxylierte Stelle (Glu35) [32], deren Carboxylierung funktionell irrelevant zu sein scheint [34].

2.1.2. Beta –(b)-Hydroxylierung

Die cDNA-Sequenz sagt ein Asp an Position 63 in humanem pdFVIIa voraus [8] (Fig. E2). Durch Homologievergleich mit anderen vitamin K-abhängigen Gerinnungsproteinen ergibt sich die Möglichkeit der b-Hydroxylierung an dieser Stelle [20, 21]. Durch verschiedene Analysemethoden, unter anderem Aminosäurenanalyse, Sequenzanalyse und Massenspektrometrie konnte gezeigt werden, dass weder nativer pdFVIIa noch rFVIIa hier ein b-hydroxy-Aspartat vorliegt [17].

2.1.3. O-Glykosylierung

Humaner pdFVIIa enthält zwei O-glykosylierte Stellen: Ser52 und Ser60 [15, 22-24]. Beide O-glykosylierten Stellen liegen sowohl in rFVIIa wie auch pdFVIIa derart modifiziert vor. Am Ser52 wurden drei verschiedene Glykane gefunden: Glucose, Glucose-Xylose oder Glucose-(Xylose)₂, bei pdFVIIa und rFVIIa (Fig. E3) [22]. Die relativen Anteile der drei O-gebundenen Strukturen unterscheidet sich bei rFVIIa leicht von denen bei pdFVIIa. An Ser60 wurde ein einzelnes Fucosemolekül bei pdFVIIa und rFVIIa gefunden (Fig. E3). Eine Studie zum funktionellen Zweck dieser O-gebundenen Glykosylierung von FVIIa unter Verwendung von mutierten Varianten legt nahe, dass die O-Glykosylierung Strukturelemente bereitstellt, die wichtig sind für die Assoziierung an TF [25].

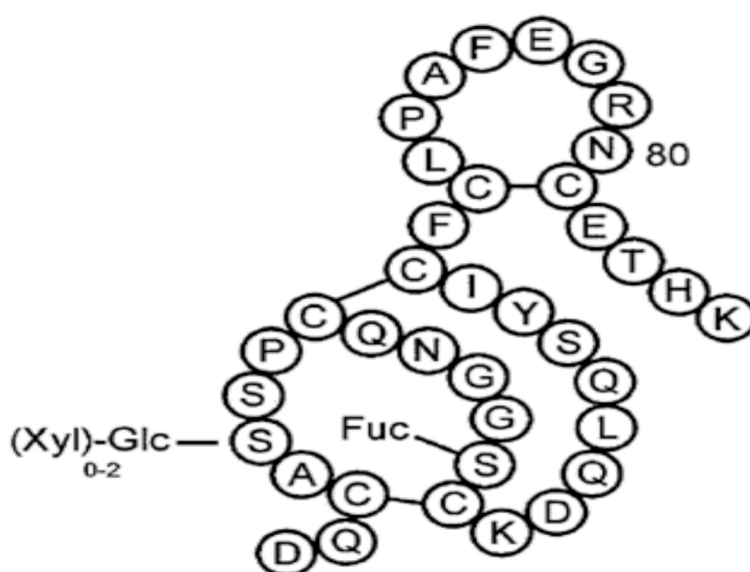


Fig. E3: O-Glykosylierung. Die an Ser52 und Ser60 O-gebundenen Kohlenhydrate in rekombinantem Faktor VII und in plasmatischem Faktor VII.

Vorkommende Zuckermoleküle:
 Glc: Glucose;
 Xyl: Xylose;
 Fuc: Fucose

2.1.4. N-Glykosylierung

Humaner pdFVIIa enthält zwei mögliche N-Glykosylierungstellen, Asn145 und Asn322. Beide Stellen werden 100%ig glykosyliert, sowohl bei pdFVIIa and rFVIIa. Nur geringgradige Differenzen in der Kohlenhydratmodifikation von pdFVIIa and rFVIIa waren feststellbar, die deutlichsten Unterschiede waren ein höherer Fucosegehalt und ein niedrigerer Sialylsäuregehalt von rFVIIa verglichen mit pdFVIIa [17]. Spätere Untersuchungen charakterisierten die N-gebundenen Kohlenhydratstrukturen rFVIIa vollständig [26-29]. Insgesamt 15 Kohlenhydratstrukturen wurden nachgewiesen, die Hauptstrukturen haben die Gestalt von komplexen, doppelantennenartigen Anhängen mit einer unterschiedlichen Anzahl an terminalen Sialylsäureresten (Fig. E4) [27]. Einige der Kohlenhydratstrukturen weisen ein N-Acetylgalactosamin (GalNAG) an der Stelle auf, wo üblicherweise Galactose angehängt ist. Normalerweise befinden sich an beiden N-Glykosylierungsstellen von rFVIIa die gleichen Zucker. Deutliche Unterschiede hingegen wurden für die zwei Stellen nachgewiesen bezüglich der relativen Häufigkeiten von Glykosylierungen: So war NAG öfter an Asn322 (30%) als an Asn145 (7%) [27] vertreten.

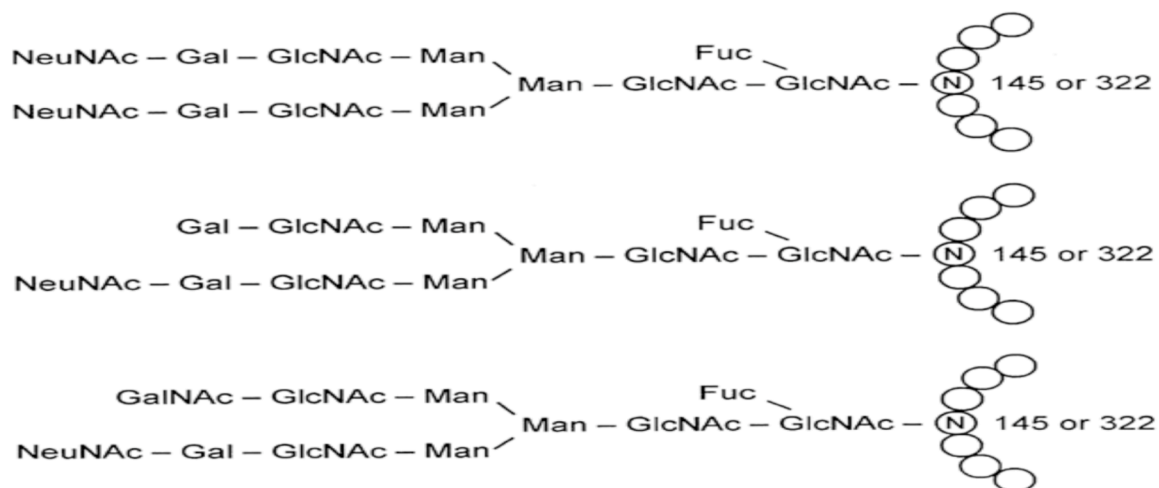


Fig. E4: N-Glykosylierung. Die drei Hauptkohlenhydratstrukturen, N-gebunden an Asn145 und Asn322 (rFVII). Substituentenbezeichnungen: Fuc, Fucose; GlcNAc, N-Acetylglucosamin; Man, Mannose; Gal, Galactose; GalNAc, N-Acetylgalactosamine; NeuNAc, N-acetylneuraminsäure (Sialylsäure)

2.1.5. Struktur-Funktionsbeziehungen von FVIIa

Der modulare Aufbau von FVIIa ermöglicht die räumliche Trennung von Vorgängen

und Eigenschaften, die zu seiner Funktion beitragen. Eine vereinfachte Zusammenfassung von Struktur bzw. Domäne zu ihrer Funktion sieht folgendermaßen aus:

2. Die N-terminale Gla-Domäne bindet an Phospholipide der Zellmembranen,
3. die C-terminale Serinprotease-Domäne schließt das katalytische Zentrum und damit die enzymatische Aktivität ein,
4. die zwei EGF-ähnlichen Domänen fungieren als Platzhalter zwischen Gla- und Proteasedomäne, und
5. alle vier Domänen tragen zur Interaktion mit TF bei.

Calciumionen binden an drei Domänen von FVIIa [9], ohne Calcium besitzt FVIIa praktisch keine biologische Aktivität. Sieben Ca-Bindungsstellen befinden sich in der Gla-Domäne, die alle besetzt sein müssen, damit FVIIa an Zellmembranen binden kann [25] wie z. B. die Oberfläche aktivierter Plättchen [7], aber auch für die Bindung an TF. Ein Calciumion bindet an die erste EGF-ähnliche Domäne, ein weiteres an die Serinprotease-Domäne, wodurch die Bindung an TF und die katalytische Aktivität beeinflusst wird [11, 12]. Unter in vivo-Bedingungen, wenn FVIIa Calciumion-gesättigt vorliegt, beschleunigt die Bindung an membranassoziierten TF die FXa- und FIXa-Bildungsrate dramatisch [13]. Die Konformationsänderungen von FVIIa bei der Bindung an TF sind geringgradig [14], wie ein Strukturvergleich von freiem und TF-gebundenem FVIIa nahelegt [9][15], und dennoch wird die Aktivität von FVIIa durch die TF-Bindung stimuliert. Dieser Effekt ist eine Folge der Interaktion der Proteasedomäne mit TF, während die anderen drei Domänen in erster Linie FVIIa an TF anheften [16].

2.1.6. rFVIIa - NovoSeven®

Unter physiologischen Umständen reicht das Thrombin aus der Initialphase aus, um die Amplifikationsphase zu starten, aber nicht, um ausreichende Mengen an aktivem Thrombin für die Bildung eines stabilen Gerinnsels und die Blutstillung zu erzeugen [52]. Die Gabe von rFVIIa erhöht die Thrombingenerierung über den Initiationsweg auf ein dem Amplifikationsweg vergleichbares Maß und ist so in der Lage, einen entsprechenden hämostatischen Effekt zu erreichen. Dieser VIIa-Effekt ist abhängig

von der physiologischen Thrombozytenfunktion und der vorhandenen Thrombozytenzahl, z. B. auch bei erworbener Hemmkörperhämophilie. Zahlen von unter 20000/ μ l verhindern zum allergrößten Teil die Wirkung von rFVIIa [53, 54]. Faktor VIIa alleine ist hämostatisch unwirksam, und sein gerinnungsauslösender Effekt in Gegenwart von Calcium hängt von seiner Bindung an TF und Phosphatidylserin (PS) ab. Bei hohen VIIa-Konzentrationen bindet er auch ohne TF an PS, welches sich auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten exponiert befindet [55, 56].

Rekombinanter aktivierter Gerinnungsfaktor VII (rFVIIa; eptacog alpha) ist der Generikaname für NovoSeven®. rFVIIa ist in mehr als 50 Ländern für die Behandlung spontaner und chirurgischer Blutungen zugelassen bei Patienten mit FVIII- und FIX-Hemmkörpern [57-63].

2.2. Herstellung von rFVIIa

2.2.1. Expression

Das humane FVII-Gen auf Chromosom 13 besteht aus 8 Exons. Die cDNA dafür wurde aus Leberzellen isoliert und in BHK-Zellen transfiziert [30]. Eine Master-Zellbank (MCB) wurde etabliert und getestet, um die Präsenz des korrekt konstruierten Gens, die Sterilität und die Abwesenheit von Mycoplasmen und Viren sicherzustellen. Diese Zellen stabil in der Expression, über mehrere Wochen verwendbar für die Kultivierung und eignen sich für die Produktion im industriellen Maßstab.

Eine Arbeitszellbank (WCB) wird aus einem einzigen Chargenteil generiert, um konstanten Bedingungen vor (Zahl der Zellpassagen) und während des Produktionsprozesses (Aussaat, Ernte, Beendigung des Kulturvorganges im Hochzelldichte-Bio-reaktor) einzuhalten. Nach einer Reihe von Produktionsschritten (Fig. E5) enthält das Zellmedium Einzelketten-rFVII und wird isoliert und aufgereinigt.

2.2.2. Aktivierung von FVII zu FVIIa

Aus der Sequenzanalyse von humanem FVII [8] wird deutlich, dass die Aktivierung von FVII zu FVIIa die spezifische Hydrolyse der Peptidbindung zwischen Arg152 und Ile153 folgt (Fig. E2). Bei der Aufreinigung von Einzelketten-FVIIa durch Ionenaustausch-Chromatographie wurde beobachtet, dass ein Teil davon in die aktive zweikettige Form überführt wurde [32], die mit der von pdFVIIa identisch ist. Nach Optimierung der Bedingungen lag die Ausbeute bei fast 100 % [17][32]. Der Aktivierungsgrad scheint abhängig vom Verhältnis der FVII- zur Ionentauschermaterial-Menge abhängig zu sein. Einzelketten-rFVII ist nicht proteolytisch aktiv [33], aber Spuren von rFVIIa könnten durch zelluläre oder mediumgebundene Proteasen erzeugt werden und damit die Selbstaktivierung während der Säulenchromatographie initiieren.

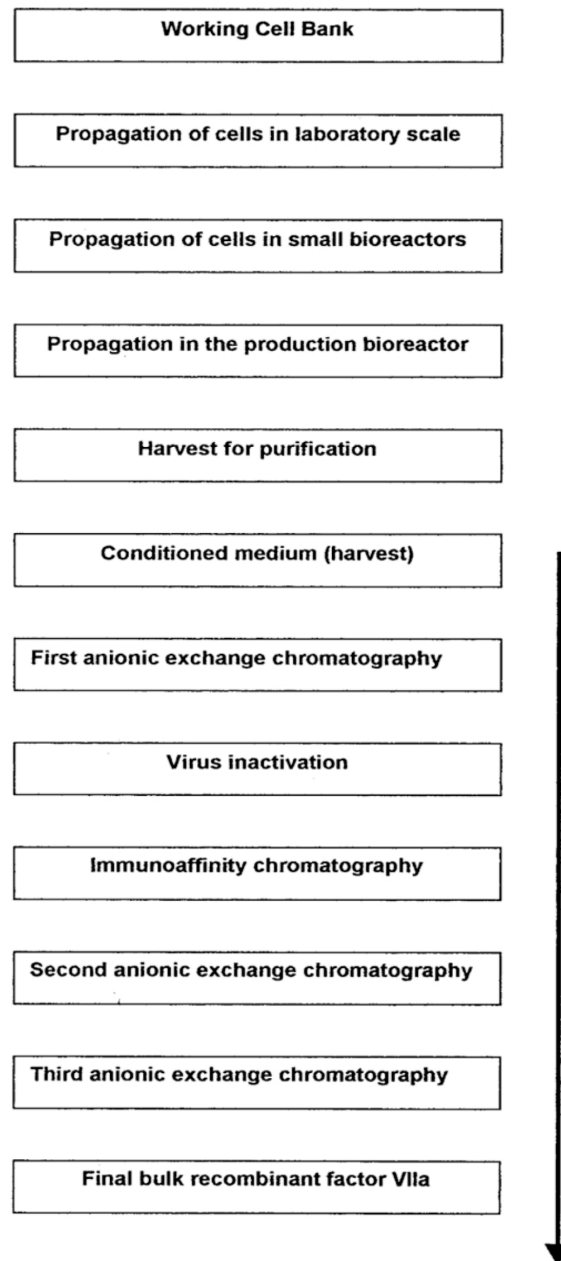


Fig. E5: Herstellungsprozess von rFVIIa. Eine Arbeitszellbank wurde aus der Masterzellbank erstellt und im Bioreaktor kultiviert. Nach einigen Vermehrungsschritten wird das Kulturmedium ersetzt und die Entnahme zentrifugiert, filtriert und gereinigt. Durch die finale Aufreinigung durch Anionenaustauschchromatographie findet eine Autoaktivierung von rFVIIa statt.

2.2.3. Aufreinigung von rFVIIa

Die Aufreinigung und die Aktivierung erfolgen in mehreren chromatographischen Schritten (Fig. E5):

1. Das Kulturmedium wird pH-adjustiert und auf Q-Sepharose FF® (Amersham Pharmacia Biotech, Hørsholm, Denmark) Säule geladen (Konzentrationschritt)
2. Virusinaktivierung durch Detergentienbehandlung.
3. rFVII-Reinigung durch Immunoaffinitätschromatographie [17].
4. Endreinigung durch zweifache Anionentauscherchromatographie.

Der aufgereinigte und aktivierte FVIIa wird in folgende pharmakologische Formulierung überführt: s. Tabelle E6. Diese Lösung wird in Glasampullen (in drei Größen 1.2 mg, 2.4 mg, und 4.8 mg) überführt und lyophilisiert.

rFVIIa	0,6 mg/ml
NaCl (50 mM)	2,92 mg/ml
Klaziundichlorid-Dihydrat (10 mM)	1,47 mg/ml
Glycylglycin (10 mM)	1,32 mg/ml
Tween 80	0,07 mg/ml
Mannitol	30 mg/ml

Tabelle E6: NovoSeven®-Formulierung des fertigen Medikaments vor der Abfüllung und Gefriertrocknung

2.3. Pharmakodynamik

rFVIIa führt nach Bindung an TF durch Aktivierung von Faktor IX und X zur IXa und Xa zur Umwandlung initial geringer Mengen von Prothrombin in Thrombin. Dieses aktiviert Thrombozyten, das die Faktoren V und VIII zu Va und VIIa aktiviert und an der Verletzungsstelle Fibrin aus Fibrinogen zur Bildung eines blutstillenden Fibringerinnsels erzeugt [64]. Pharmakologische Dosen von N7 aktivieren Faktor X zu Xa direkt auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten am Läsionsort unabhängig von TF. Damit wird die erhöhte lokale Bildung von Xa, Thrombin und Fibrin bewirkt.

2.4. Pharmakokinetik in Patienten

2.4.1. Klinische Anwendung und zugelassene Indikationen

rFVIIa wird eingesetzt zur Behandlung von Blutungen und Prophylaxe von Blutungen im Zusammenhang mit chirurgischen oder invasiven Eingriffen [64, 178] bei folgenden Patientengruppen:

- bei Patienten mit angeborener Hämophilie mit Hemmkörpern gegen Blutgerinnungsfaktoren VIII oder IX ≥ 5 BE [80, 86-88]
- bei Patienten mit angeborener Hämophilie, bei denen mit einem starken Anstieg des Hemmkörpers bei Verabreichung von Faktor VIII oder Faktor IX zu rechnen ist [57-63, 126, 127, 130, 200]
- bei Patienten mit erworbener Hämophilie [57-59]
- bei Patienten mit angeborenem Faktor VII-Mangel [47, 153]
- bei Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann [50, 150-160, 162, 201, 207] mit Antikörpern gegen Glykoprotein IIb/IIIa und/oder HLA und mit früherem oder aktuellem Refraktärzustand auf Transfusionen von Thrombozytenkonzentraten.

2.4.2. Hemmkörper-Hämophilie A und B

Die Pharmakokinetik von NovoSeven wurde unter Verwendung eines Faktor VII-Gerinnungs-Assays anhand von 25 Fällen ohne vorausgegangene Blutung sowie 5 Fällen unter einer Blutung untersucht. Die Faktor VII-Gerinnungsaktivitäten im Plasma, entnommen vor und während eines Zeitraums von 24 Stunden nach der Gabe von NovoSeven, wurden analysiert. Die Pharmakokinetik bei Einzeldosen von 17,5 µg, 35 µg und 70 µg pro kg Körpergewicht zeigte ein lineares Verhalten. Während blutungsfreier Intervalle betrug das Verteilungsvolumen bei Steady-State und bei der Elimination 106 und 122 ml/kg; in Blutungsfällen fanden sich Werte von 103 und 121 ml/kg (Medianwerte) [40]. Der Medianwert der Clearance betrug in blutungsfreien Intervallen 31,0 ml/h x kg und 32,6 ml/h x kg in den Blutungsfällen. Die Ausscheidung des Arzneimittels wurde durch die mittlere Verweildauer und die Halbwertszeit beschrieben [40, 51]. Während der blutungsfreien Intervalle betrug die mittlere Verweildauer 3,44 h und die Halbwertszeit 2,89 h (Medianwerte); in den

Blutungsfällen betrug die mittlere Verweildauer 2,97 h und die Halbwertszeit 2,30 h (Medianwerte) [40, 89]. Der Median der in vivo Plasma-Wiederfindungsrate (Recovery) war 45,6 % bei Patienten in blutungsfreien Intervallen und 43,5 % bei Patienten in Blutungsfällen [51].

2.4.3. Faktor VII-Mangel

Die Pharmakokinetik bei NovoSeven-Einzeldosen von 15 µg und 30 µg pro kg Körpergewicht zeigte keinen signifikanten Unterschied der beiden verwendeten Dosen im Hinblick auf dosisunabhängige Parameter: Ganzkörper-Clearance (70,8 – 79,1 ml/ h x kg), Verteilungsvolumen bei Steady-State (280 – 290 ml/kg), mittlere Verweildauer (3,75 – 3,80 h) und Halbwertszeit (2,82 – 3,11 h). Die mittlere in vivo Plasma-Wiederfindungsrate betrug ungefähr 20 % [153].

2.4.4. Thrombasthenie Glanzmann (TG)

Die Pharmakokinetik von NovoSeven bei Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann wurde noch nicht untersucht; es werden jedoch ähnliche pharmakokinetische Werte wie bei Patienten mit Hämophilie A und B erwartet [28].

2.5. Dosis, Dosierungsbereich und Behandlungsintervalle

2.5.1. Hämophilie A oder B mit Hemmkörpern oder erworbene Hämophilie

NovoSeven sollte so früh wie möglich nach dem Beginn einer Blutung verabreicht werden. Es wird eine Initialdosis von 90 µg pro kg Körpergewicht als intravenöse Bolusinjektion empfohlen. Nach dieser Initialdosis von NovoSeven können weitere Injektionen erforderlich sein. Die Dauer der Behandlung sowie die Intervalle zwischen den Injektionen ist abhängig vom Schweregrad der Blutung bzw. des invasiven oder chirurgischen Eingriffs. Die Behandlungsintervalle sollten zu Beginn 2 bis 3 Stunden betragen, um Hämostase zu erreichen. Falls eine Fortführung der Therapie notwendig sein sollte, können die Behandlungsintervalle nach Erreichung der Hämostase sukzessive auf 4, 6, 8 oder 12 Stunden verlängert werden, solange eine Weiterbehandlung als indiziert betrachtet wird [57-59]. Leichte bis

mittelschwere Blutungen (einschließlich ambulanter Behandlung) Im Rahmen der ambulanten Behandlung hat sich die frühzeitige Gabe von 90 µg pro kg Körpergewicht bei leichten bis mittelschweren Gelenk-, Muskel- und Schleimhautblutungen als wirksam erwiesen. 1 bis 3 Einzelgaben in 3-Stunden-Intervallen wurden verabreicht, um die Blutung zu stillen, sowie eine zusätzliche einmalige Gabe zur Erhaltung der Hämostase. Die Dauer der ambulanten Behandlung sollte 24 Stunden nicht überschreiten. Bei schweren Blutungen wird als Richtwert eine initiale Dosierung von 90 µg pro kg Körpergewicht empfohlen. Diese kann auf dem Weg zur medizinischen Einrichtung verabreicht werden, in der der Patient gewöhnlich behandelt wird. Die nachfolgende Dosierung richtet sich nach Typ und Schweregrad der Blutung. Die Behandlungen sollten zu Beginn in Abständen von 2 Stunden erfolgen, bis sich eine klinische Besserung zeigt. Falls eine Fortführung der Therapie angezeigt ist, können die Behandlungsintervalle für 1 – 2 Tage auf 3 Stunden, anschließend dann sukzessive auf 4, 6, 8 oder 12 Stunden verlängert werden. Die Therapie einer schweren Blutung kann 2 – 3 Wochen betragen, falls klinisch angezeigt, auch länger. Bei invasiven bzw. chirurgischen Eingriffen sollte eine Initialdosis von 90 µg pro kg Körpergewicht unmittelbar vor Beginn der Intervention als intravenöse Injektion erfolgen. Nach 2 Stunden sollte die Injektion mit gleicher Dosis wiederholt werden. Anschließend sollten die Behandlungsintervalle für die Dauer von 24 bis 48 Stunden jeweils 2 – 3 Stunden betragen, je nach Eingriff und klinischem Zustand des Patienten. Bei großen Operationen sollte die Therapie 6 – 7 Tage lang mit Behandlungsintervallen von 2 – 4 Stunden fortgesetzt werden. Danach können die Behandlungsintervalle für weitere 2 Wochen auf 6 – 8 Stunden verlängert werden. Nach großen chirurgischen Eingriffen kann die Therapiedauer bis zu 2 – 3 Wochen, bis zur Wundheilung, betragen [64, 80, 81].

2.5.2. Thrombasthenie Glanzmann (TG)

Zur Behandlung von Blutungen und zur Prophylaxe von Blutungen bei invasiven und chirurgischen Eingriffen wird eine Dosis von 90 µg (Dosierungsbereich von 80 bis 120 µg) pro kg Körpergewicht alle 2 Stunden (1,5 – 2,5 Stunden) empfohlen. Zur Gewährleistung einer effektiven Hämostase sollten mindestens drei Dosen verabreicht werden. Die empfohlene Art der Verabreichung ist die Bolus-Injektion, da

bei einer kontinuierlichen Infusion fehlende Wirksamkeit auftreten kann. Bei nicht therapierefraktären Patienten sind Thrombozyten die Therapie der ersten Wahl bei Thrombasthenie Glanzmann [50, 150-160, 162, 201, 207].

2.5.3. Faktor VII-Mangel

Zur Behandlung von Blutungen bei invasiven und chirurgischen Eingriffen wird eine Dosis von 15 – 30 µg pro kg Körpergewicht alle 4 – 6 Stunden bis zum Erreichen einer Hämostase empfohlen. Dosis und Behandlungsintervalle müssen auf jeden Patienten individuell abgestimmt werden [64, 90, 91].

2.6. Sicherheit bei klinischer Anwendung von rFVIIa

Seit Juli 1996 wurde rFVIIa mehr als 180.000mal in Standarddosen angewendet. Die Häufigkeit dokumentierter, spontaner, schwerer unerwünschter Nebenwirkungen pro Behandlung liegt bei 0.6%. Die Inzidenz thrombotischer Ereignisse liegt unterhalb von 0.4%, und 50% traten bei Patienten auf, die älter als 65 Jahre waren [92]. Bei Patienten, die durch ihre Grunderkrankung bereits für die Entwicklung einer DIC prädisponiert sind, kann ein theoretisches Risiko für die Entwicklung einer systemischen Gerinnungsaktivierung nicht völlig ausgeschlossen werden, obwohl dieses nach den bisherigen klinischen Erfahrungen nach Markteinführung nicht als wesentliche Nebenwirkung des Arzneimittels berichtet wurde. Nach Überdosierung beim Menschen wurde bisher kein Fall einer dadurch ausgelösten thrombotischen Komplikation bekannt, selbst nicht nach versehentlicher Gabe von 800 µg pro kg Körpergewicht [93]. Seit Markteinführung wurden spontan keine anaphylaktischen Reaktionen berichtet; Patienten mit anamnestisch bekannten allergischen Reaktionen sollten dennoch aufmerksam überwacht werden. Bei Hämophilie A- oder B-Patienten wurde keine Antikörperentwicklung gegen Faktor VII berichtet [90].

2.6.1. Nebenwirkungen

Die Erfahrung seit Markteinführung zeigt, dass Nebenwirkungen nur selten (<1 pro 1000 Standarddosen von 90 µg/kg bw) auftreten [96]. Bezogen auf das Organsystem sind die Häufigkeiten der schwerwiegenden als auch nicht-

schwerwiegenden Nebenwirkungen seit Markteinführung wie folgt verteilt:

- Arterielle, thrombotische Ereignisse, wie z. B. Myokardinfarkte oder Ischämie, zerebrovaskuläre Störungen und Darminfarkt. In der großen Mehrheit aller Fälle waren die Patienten prädisponiert für arterielle thrombotische Störungen, entweder aufgrund einer Grunderkrankung, aufgrund des Alters, aufgrund von atherosklerotischen Erkrankungen oder aufgrund der aktuellen gesundheitlichen Verfassung.
- Venöse thrombotische Ereignisse, wie z. B. Thrombophlebitis, tiefe Venenthrombosen und damit verbundene Lungenembolie. Auch hier waren großen Mehrheit aller Fälle die Patienten aufgrund gleichzeitig bestehender Risikofaktoren prädisponiert für venöse thrombotische Ereignisse, entweder aufgrund gleichzeitig bestehender Risikofaktoren, vorangegangener thrombotischer Ereignisse, postoperativer Immobilisation oder durch Einsatz eines Venenkatheters.

2.6.2. Studien

Das klinische Entwicklungsprogramm für NovoSeven beinhaltet Studien der Phase III, die sich auf die Indikationen der intrazerebralen Blutung [65] und Schlaganfallpatienten [98] Traumapatienten erstrecken. Studien der Phase II mit den Indikationen stumpfes Trauma [99] und wirbelsäulenchirurgische Eingriffe [97], und weitere Studien für die Indikationen obere Gastrointestinalblutung [95], kardiochirurgische Eingriffe [94], liegen ebenfalls vor.

2.7. Thrombozytenfunktionsstörungen

Patienten mit quantitativen oder qualitativen Thrombozytopathien (z. B. Thrombozytopenie, Thrombasthenie Glanzmann oder das Bernard-Soulier-Syndrome) konnten erfolgreich mit rFVIIa behandelt werden [48-50].

2.7.1. Thrombasthenie Glanzmann

Der Fibrinogenrezeptor (Glykoprotein (GP) IIb/IIIa, CD41/CD61) ist ein calciumabhängiges, nicht kovalent assoziiertes Heterodimer, der sich ausschließlich auf der Plättchenoberfläche und in -internen Pools befindet und während der Hämostase die fibrinogenabhängige Plättchenaggregation und die Thrombozyten-adhäsion an subendotheliale Matrixproteine wie Fibronectin und van-Willebrand-Faktor mediiert. Der Rezeptor wird in der Regel nur als intakter Komplex in die Zellmembran integriert; Mutationen in einer Untereinheit stören meist das Zusammenlagern der Untereinheiten im Golgi-Apparat [60,67]. Ein Mangel an oder ein Funktionsdefekt des GP IIbIIIa verursacht Thrombasthenie Glanzmann (GT), eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die mit einer gesteigerten Blutungsneigung, Schleimhautblutung, Epistaxis und Purpura sowie Menorrhagien einhergeht. Die Therapie besteht im Fall elektiver oder notfallmäßiger Eingriffe in Thrombozytenkonzentrat-Transfusionen, obwohl das Risiko der Alloimmunisierung und Posttransfusioneller Purpura besteht. Rekombinanter FVIIa ist für den Fall vorliegender Autoantikörper bereits zugelassen worden. [28,84]

3. Der Thrombinbildungstest – eine Methode zur Charakterisierung der Gerinnungsaktivität von Plasma unter Therapie mit N7

Bisher geschieht die Wirksamkeitsüberwachung (Monitoring) von rFVIIa labordiagnostisch, wenn labordiagnostisch durchgeführt, mithilfe der Prothrombinzeit (PT oder Quick-Test). Meistens erfolgt jedoch eine primäre Dosierung nach Körpergewicht und eine Beurteilung oder Dosisanpassung nach der klinischen Situation. Das PT-Monitoring ist nur eingeschränkt aussagekräftig, weil es ausschließlich in zellfreiem Plasma durchgeführt wird, ohne die Rolle der Thrombozyten im Gerinnungsablauf zu berücksichtigen. Die erhaltenen Quick-Test Prozentwerte oder INR-Werte stehen in keinem Verhältnis zur beobachteten Klinik, da schon sehr niedrige therapeutische Dosen von N7 Quick- bzw. INR-Werte in den Normalbereich senken [67], aber andererseits sich auch keine Korrelation in einem beobachteten Patientenkollektiv erfassen lässt [68], dies alles, ohne dass entsprechend häufig Thrombosen auftreten [69]. Betrachtet man den Einfluß der

Plättchen von verschiedenen gesunden Probanden in normiertem Plasma, können die Aktivitäten von Tenase und Prothrombinase individuell um das 2-3fache variieren [10]. Zur Bestimmung des Gerinnungsstatus eines Patienten wird bei Bestimmung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) oder der PT Plasma aktiviert und die Zeit bis zur Gerinnung der Probe gemessen. Diese tritt schon bei einer Thrombinkonzentration von 10-20 nmol/l im Ansatz ein, der weitere Anstieg auf Werte bis zu 100 - 300 nmol/l Thrombin, vor allem nach extrinsischer Aktivierung, kann durch diese Methoden nicht abgebildet werden [66]. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit eines Tests, der den Verlauf der Gerinnung von der Aktivierung bis zur Deaktivierung des Thrombins in seinem Verlauf, also kinetisch und über die ganze Verlaufszeit, abbildet. Weiterhin sollten essentielle, in vivo vorhandene beteiligte Zellen wie die Thrombozyten präsent sein. Die beteiligten Reagenzien dürfen dabei den Verlauf des Testes nicht wesentlich beeinflussen.

Erst mit dem von Hemker et al. [66, 75 103] beschriebenen Thrombinbildungstest wurde die Darstellung der Gerinnungsaktivierung im Plasma durch kontinuierliche Bestimmung der Thrombinkonzentration über die Zeit möglich. Die Methode wurde bereits weiterentwickelt und zur Wirksamkeitsuntersuchung (Monitoring) von Antikoagulantien eingesetzt [70]. In dieser älteren Form des Thrombinbildungstests wird plättchenarmem Plasma (platelet poor plasma, PPP) ein spezielles chromogenes Thrombinsubstrat zugesetzt, die Gerinnung extrinsisch oder intrinsisch aktiviert und die optische Dichte über 15 min im 30-Sekundentakt gemessen. Da das chromogene Substrat muss dabei selektiv durch Thrombin gespalten werden und sein Einfluss auf die Wechselwirkungen des Thrombins mit seinen physiologischen Reaktionspartnern und Inhibitoren möglichst gering sein soll, muss das Substrat eine geringe Affinität zu Thrombin, also einen hohen K_m -Wert aufweisen und in entsprechend niedriger Konzentration im Ansatz vorliegen. Voraussetzung für den proportionalen Zusammenhang von Spaltungsrate und Enzymkonzentration ist aber, dass die Substratkonzentration während der Messung nahezu konstant bleibt (d. h. Substratumsatz < ca. 10 %), somit muss das Substrat einen niedrigen k_{cat} -Wert aufweisen. Wenn diese postulierten Bedingungen [66] erfüllt sind, kann aus der Messkurve und den Substratkonstanten die Thrombinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit berechnet werden (Fig. E7).

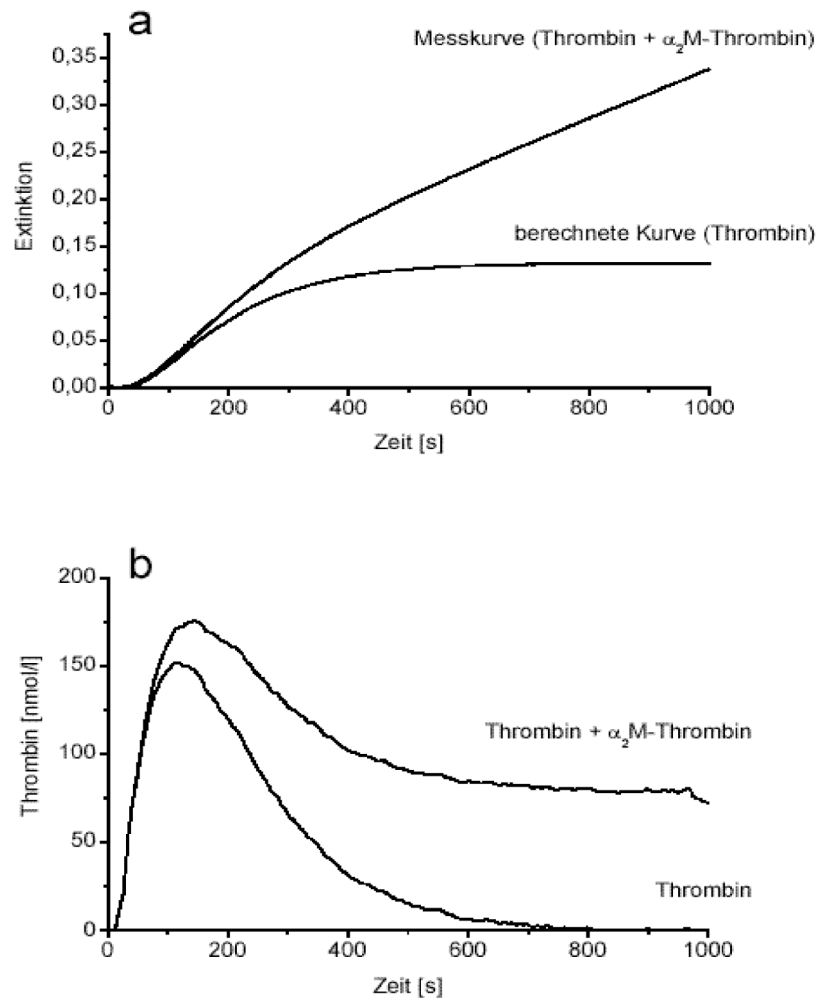


Fig. E7: Kontinuierliche Messung der Thrombinbildung in plättchenarmem Plasma (extrinsische Aktivierung durch TF-Zusatz) [70]

a:

typische Messkurve: Die Fluoreszenzintensität summiert sich mit der Zeit auf (Substratspaltung durch freies Thrombin und α_2 M-gebundenes Thrombin) sowie die korrigierte Kurve (Substratspaltung durch freies Thrombin ohne α_2 M)

b:

Thrombinkonzentrations-Zeit-Kurven zeigen die Thrombinaktivierung pro Zeit (α_2 M-korrigiert und –unkorrigiert)

4. Zielsetzung der Arbeit

- Ziel der Arbeit ist, einen Gerinnungstest für die therapeutische Wirksamkeitsüberwachung von rFVIIa unter Einbeziehung von plättchenreichem Plasma (PRP) zu entwickeln, da die rFVIIa-Wirkung thrombozytenabhängig ist. Dafür soll ein Testprozedere auf Basis des Thrombinbildungstestes nach Hemker etabliert werden, das die Ermittlung einer Dosis-Wirkungskurve im therapeutischen Zielbereich gestattet.
- Zunächst sollte der Test auf grundsätzliche Durchführbarkeit im PRP gesunder Probanden untersucht werden.
- Der Testes sollte im PRP geeigneter Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann (heterozygot und homozygot) analog zum Ablauf mit den Proben gesunder Probanden validiert werden.
- Der Nachweis der Medikamentenwirkung von rFVIIa bei einem geeigneten Patienten (Thrombasthenie Glanzmann), begleitend durchgeführt im Rahmen einer operativen Intervention (Zahnextraktion).

Methoden

1. Plasmapräparation

1.1. Präparation des plättchenreichen Plasmas (PRP)

Nach Stauung und Venenpunktion wird Blut in ein 9 ml Sarstedt-Blutentnahmeröhrchen (Endkonzentration 3,18 % Citrat) überführt und anschließend für 5 min bei 750 g zentrifugiert. Das PRP wird anschließend in ein separates, nicht gerinnungsauslösendes Plastikgefäß transferiert.

1.2. Präparation des plättchenarmen Plasmas (PPP)

PPP für die etablierten Gerinnungsteste (Quick, aPTT etc.) wird aus PRP oder Vollblut erzeugt, indem das Ausgangsmaterial für 40 min bei 3000 g zentrifugiert wird. Das PPP wird anschließend in ein separates, nicht gerinnungsauslösendes Plastikgefäß transferiert und bei $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2. Der Thrombinbildungstest in plättchenreichem Plasma – eine weiterentwickelte Methode zur Charakterisierung der Gerinnungsaktivität von Plasma unter Beteiligung der Thrombozyten (thrombin generation test oder TGT)

2.1. Messung der Thrombinaktivität

Grundlage des Messverfahrens ist die Serinproteasefunktion von aktiviertem Thrombin, die auch Teil- oder sequenzähnliche Peptide der Schnittstellen natürlicher Substrate spaltet. Das Substrat wird an der P¹-analogen Position, d. h. der ersten, aminoterminalen Aminosäureposition nach der gespaltenen Bindung, mit einem Fluorochrom versehen, das nach der Abspaltung vom Restpeptid die gewünschten Fluoreszenzeigenschaften zeigt. Eine Zunahme der gemessenen Fluoreszenz gibt daher auch eine größere vorhandene Enzymaktivität an. Die Affinität des Substrates (Bindungskonstante) zum Enzym liegt um ca. 10^3 - 10^5 unter der der natürlichen Substrate, um deren Spaltung und Aktivierung nicht relevant zu beeinflussen. Ein fluorogenes Substrat wurde dem chromogenen vorgezogen, um Lichtstreuung und Signalschwankungen durch Fibrin-Thrombozyten-Komplexe sowie die

Wechselwirkungen mit Fibrinpolymerisationsblockern wie z. B. Pefabloc® zu vermeiden.

2.2. Aktives, inaktives, freies und gebundenes Thrombin – die α_2 -Makroglobulin (α_2 M)-Korrektur

Freies Thrombin wird durch seine endogenen Inhibitoren Antithrombin und α_2 -Makroglobulin (α_2 M) gehemmt und somit unter physiologischen Bedingungen die Fibrinogenspaltung unterbunden. α_2 M-gebundenes Thrombin bleibt gegenüber niedermolekularen Verbindungen, wie dem eingesetzten chromogenen Substrat, aktiv. Die Extinktionsänderung setzt sich daher aus der Spaltungsleistung von freiem und α_2 M-gebundenem Thrombin zusammen. Die α_2 M-Konzentration ist zwar vom Spender abhängig, bleibt jedoch unter der Messung konstant. Daher kann der Anteil der Substratspaltung durch den α_2 M-Thrombin-Komplex und damit die enzymatische Aktivität des freien Thrombins in einem von Hemker et al [75] entwickelten Korrekturalgorithmus einfach berechnet werden (Auswirkung s. Fig. M2). Sind Thrombinbildung und -inaktivierung abgeschlossen, ändert sich die Konzentration des α_2 M-Thrombin-Komplexes nicht mehr, die Messkurve nimmt einen linearen Verlauf. Wird dieser lineare Anteil von der Messkurve abgezogen, stellt die Differenz die auf freiem Thrombin beruhende Extinktion dar. Liegt kein freies, nicht α_2 M-gebundenes Thrombin mehr vor, verläuft die berechnete Extinktions-Zeit-Kurve parallel zur Zeit-Achse.

Abbildung E6a und E6b zeigt die aus der Messkurve berechneten Thrombinbildungskurven. Die Fläche unter der Kurve für freies und α_2 M-gebundenes Thrombin als auch für freies Thrombin, spiegeln Ausmaß und Geschwindigkeit der Thrombinbildung wieder. Die Fläche (area under the curve, AUC), die die Konzentrations-Zeit-Kurve für freies Thrombin einschließt, wurde von Hemker et al. als Endogenes Thrombinpotential [66] bezeichnet und dient als Maß für das Gerinnungspotential einer Plasmaprobe.

2.3. Ablauf der Messung

Die Messung wird in 96- oder 384-well Mikrotiterplatten (Greiner) und einem Fluorometer (Fluoroskan Ascent Typ 374, Thermo Labsystems, Fig. ab) durchgeführt.

Der Reaktionsansatz besteht aus 80 µl PRP, 20 µl des Gerinnungsauslösers und 20 µl Fluorochrom für die 96-well-Platte bzw. 25 µl PRP und jeweils 6,25 µl Gerinnungsauslöser und Fluorochrom für die 384-well-Platte, also jeweils im Verhältnis $\frac{2}{3} : \frac{1}{6} : \frac{1}{6}$ des Gesamtansatzes pro Well. rFVIIa wird in Puffer A aufgelöst, so dass die Endkonzentrationen im Reaktionsansatz bei 50, 100, 200, 500 und 1000 U/ml) liegen.

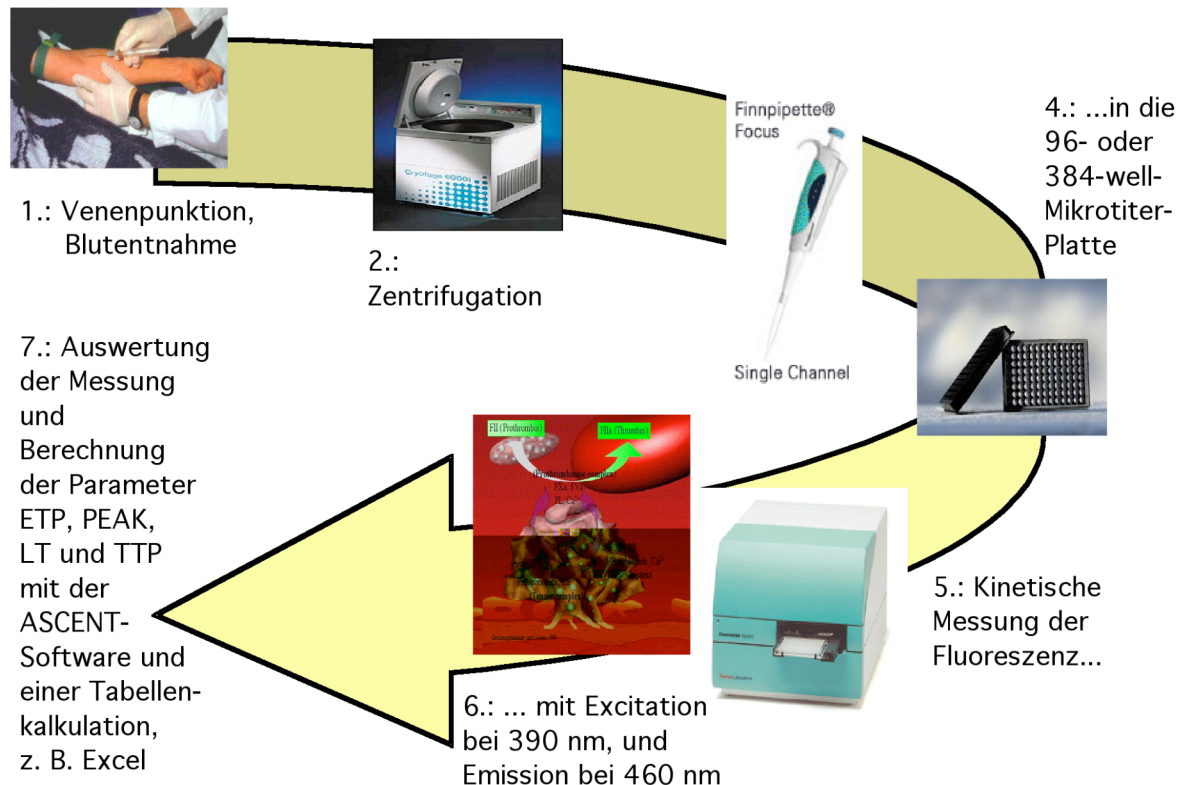


Fig. M1: Ablauf des TGT, Schrittfolge entlang des gelben Pfeils

Die Gerinnungsreaktion wird durch Zugabe des Fluorochroms und der Calciumionen, die mit HEPES/BSA-Puffer auf 833 µM (Fluorochrom) und 16,7 mM (Calciumchlorid) eingestellt werden, gestartet. Vorher werden PRP und Gerinnungsauslöser zusammen auf der Platte 5 min bei 37 °C inkubiert.

Die Signaldetektion findet bei einer Anregungswellenlänge von 390 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm statt. Die Detektionszeit pro Messung liegt bei 20 ms, das Meßintervall pro well bei 20 s. Die Zahl der Meßpunkte liegt bei 200, die Laufzeit für eine Kinetik daher bei 66 min 20 s. Die Ansätze werden als gleichzeitige Vierfachbestimmungen ausgeführt.

2.4. Auswertung der TGT-Meßdaten

Die Fluoreszenz-Meßwerte für jedes Well werden je nach Auftragung der Proben in Reihen oder Spalten sortiert und in ein Excel-Datenblatt transferiert. Die einzelnen Werte einer Vierfachbestimmung pro Zeitpunkt werden nach der Zeit abgeleitet, indem die Differenz der Fluoreszenz durch die Differenz der Zeit zwischen zwei Meßpunkten geteilt wird. Daraus wird zur weiteren Auswertung ein Medianwert aus jeweils vier parallel gemessenen, gleichartigen Ansätzen gebildet. Aus der daraus resultierenden Median-Verlaufskurve der Fluoreszenzänderung pro Zeitintervall innerhalb des Messzeitraums lassen sich

- das endogene Thrombinpotential (ETP),
- die größte Geschwindigkeit der Thrombinbildung (PEAK),
- die Zeit vom Start der Messung bis zum Erreichen des PEAK (TIME TO PEAK) und
- die Länge der Latenzphase (LAG TIME) mit langsamem Anstieg der Thrombinaktivität und starken relativen Fluoreszenzschwankungen auf niedrigem Niveau.

Die Latenzphase reicht vom Start der Messung bis zum Beginn der exponentiell zunehmenden Phase der Thrombinbildungsgeschwindigkeit (Burst-Phase), wobei die Latenzphase der Initiationsphase und die Burst-Phase der Propagationsphase der Thrombinbildung im Verlauf der Hämostase entspricht [148]. (Fig. M2).

Damit wird der Verlauf der Thrombinbildung im Experiment durch einen summativen, integrativen Parameter (ETP) und drei differentielle, zeit- und signalveränderungsabhängige (PEAK, TIME TO PEAK, LAG TIME) beschrieben.

2.4.1. ETP

Das ETP bezeichnet die Fläche unter der Kurve (AUC), die durch Reintegration der ersten Ableitung des Fluoreszenzsignals nach der Zeit innerhalb des Messzeitraums, hier 66 min, erhalten wird. Damit hat das ETP die Einheit relative Fluoreszenzeinheiten (RFU), da $y_{t_{ende}} \text{ [RFU]} = \int_{t_{start}}^{t_{ende}} \text{Fluoreszenzwert/Zeiteinheit [RFU/min]} \cdot \Delta t \text{ [min]}$ gilt. Die nach der Inaktivierung von Thrombin durch α_2 -

Makroglobulin verbleibende substratspaltende Aktivität wird durch die Anwendung eines bereits publizierten Algorithmus auf die erste Ableitung des Fluoreszenzsignals als dessen Resultat vom Signal abgezogen [75].

2.4.2. PEAK

Der maximale y -Wert der ersten Ableitung des Fluoreszenzsignals (relative Fluoreszenzeinheiten oder RFU) nach der Zeit, $y = \Delta \text{RFU} / \Delta t$ [$\text{RFU} / \text{min}^{-1}$], innerhalb des Messzeitraums gibt die größte Thrombinbildung pro Zeiteinheit innerhalb eines Meßintervalls, hier 20 s, wieder. Der PEAK wird daher auch als maximale Thrombinbildungsgeschwindigkeit bezeichnet.

2.4.3. TIME TO PEAK

Der Zeitraum bis zum Erreichen des PEAK wird von der Zugabe des Fluorochroms zusammen mit gelösten Calcium-Ionen, nach Vorinkubation des mit einem Gerinnungsauslöser versetzten Plasmas, bis zum Erreichen des PEAK, gemessen. Sie ist der zum PEAK gehörige Wert auf der Zeitachse (x -Achse) der ersten Ableitung des Fluoreszenzsignals.

2.4.4. LAG TIME

Dieser Parameter ist definitionsabhängig, da zur Bestimmung der Latenzphasenlänge eine Definition nötig ist, wann diese als beendet angesehen wird. Da sich die Burst-Phase von der Latenzphase durch die deutlich größere und schneller zunehmende Thrombinbildungsgeschwindigkeit unterscheidet, die Dynamik der Thrombinbildung hingegen individuell und gerinnungsauslösungsspezifisch in den einzelnen Phasen variiert, wurde von Hemker et al. [103] 2000 ein Algorithmus zur Ermittlung einer dynamischen Schwelle und zur Unterscheidung der beiden Phasen definiert. Dafür wird aus den Fluoreszenzwerten ein laufender, kumulierender Durchschnitt (Mittelwert) sowie die zugehörige Standardabweichung (SD) ermittelt. Bricht das Signal aus der dynamischen Schwankungsbreite von ± 2 SD aus, wird dieses als Ende der Lag-Phase gewertet, und man erhält so einen geeigneten Wert für den Beginn der Burst-Phase und das Ende der LAG TIME.

Methoden der Messung des endogenen Thrombinpotentials (ETP)

Testablauf DKD: Thrombinpotential (ETP)

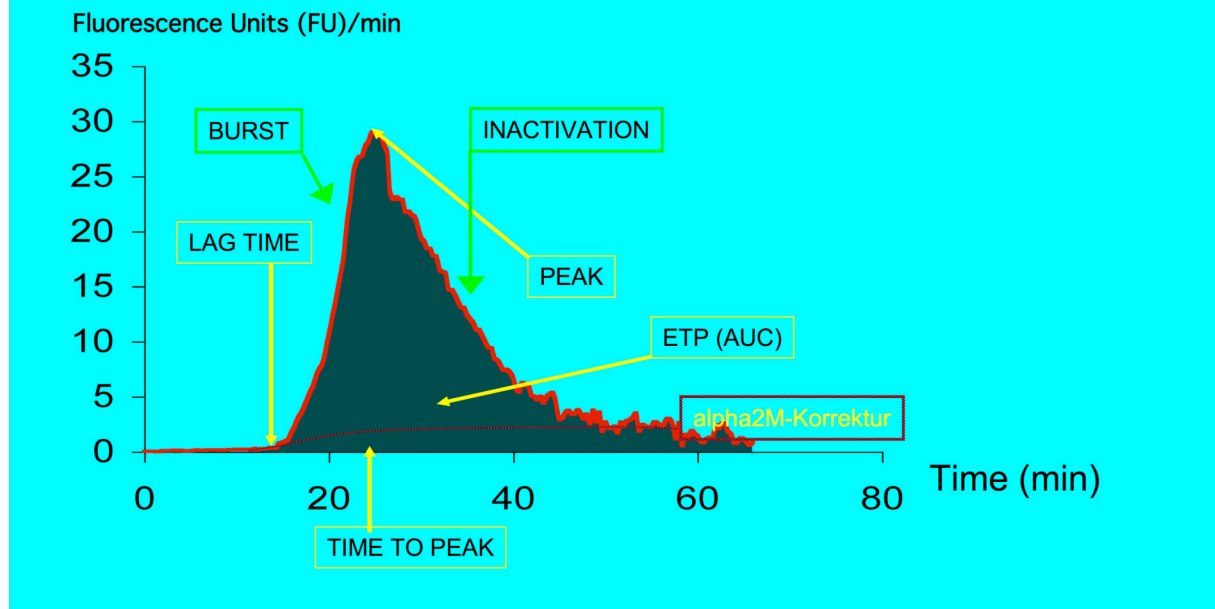


Fig. M2: Charakteristischer Verlauf der Thrombinbildung mit den einzelnen Parametern. Die von der gestrichelten alpha2M-Korrekturkurve abgetrennte untere Teilfläche der hier dargestellten AUC wird bei der Berechnung der korrigierten AUC (ETP-AUC) mit Hilfe des Korrekturalgorithmus abgezogen.

3. Durchflusszytometrie und FACS-Analyse

3.1. Durchflusszytometrie

Der Begriff „FACS“ ist eigentlich ein registriertes Markenzeichen der Firma Beckton Dickinson und steht für „Fluorescence Activated Cell Sorting“. Inzwischen hat sich der Begriff aber als allgemeine Bezeichnung für die Durchflusszytometrie durchgesetzt.

Die Grundlagen für die Durchflusszytometrie wurden 1952 von Wallace Coulter gelegt. Er beschrieb als erster ein Instrument, mit dem man Zellzahl und Zellgröße elektronisch bestimmen konnte. Dazu mussten die in einer leitenden Flüssigkeit schwimmenden Zellen einzeln einen Messpunkt passieren. Durch die Entwicklung dieses Gerätes wurde das Zählen von gelösten Partikeln und somit z.B. die Leukozytenzählung für eine Blutanalyse wesentlich erleichtert (McCarthy et al., 2001). Die Durchflusszytometrie ermöglicht also das Zählen bestimmter Partikel - im vorliegenden Fall Thrombozyten - und erlaubt darüber hinaus Aussagen über Eigenschaften der gemessenen Teilchen.

Ein Prinzip der Durchflusszytometrie beruht grundsätzlich auf Streulicht. Die zu untersuchenden Zellen wandern hintereinander, in einem Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert, durch eine dünne Messkammer und erzeugen je nach Zellgröße, Granularität und Membranbeschaffenheit ein Streulicht, wenn sie von einem Laserstrahl getroffen werden. Das Streulicht (Scatter) kann dann in verschiedenen Winkeln von dem FACS-Gerät gemessen werden (Fig. M3) und liefert somit mehrere Informationen über die Eigenschaften der verwendeten Zellen.

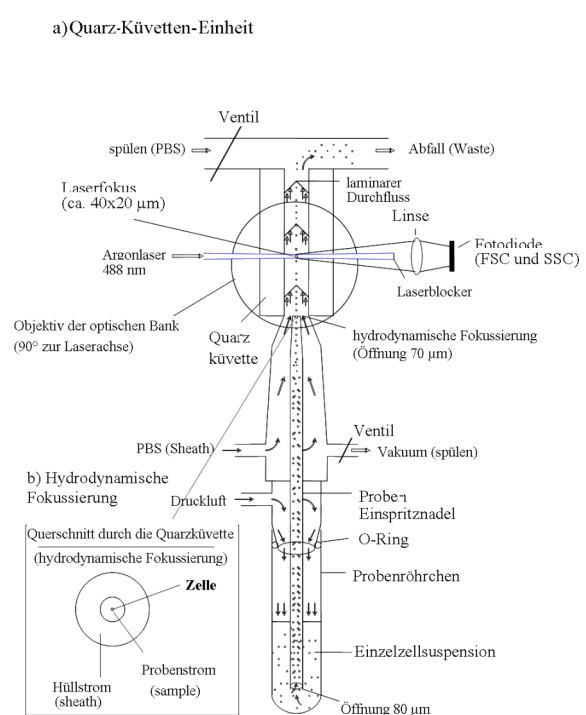


Fig. M3: Schematische Abbildung der Quarzküvette eines BD FACScan-Gerätes mit hydrodynamischer Fokussierung.

Meist wird das Vorwärtstreulicht (Forward-Scatter, FSC) in einem Winkel von $0,7^\circ$ - 10° und das Seitwärtstreulicht (Side-Scatter, SSC) etwa im 90° -Winkel zum ursprünglichen Strahl gemessen. Die Größe des Forward-Scatters hängt vor allem von der Größe der Zellen ab, während der Side-Scatter vor allem von der Binnenstruktur der Zelle, ihrer Dichte und der Membranfaltung bestimmt wird [71, 72].

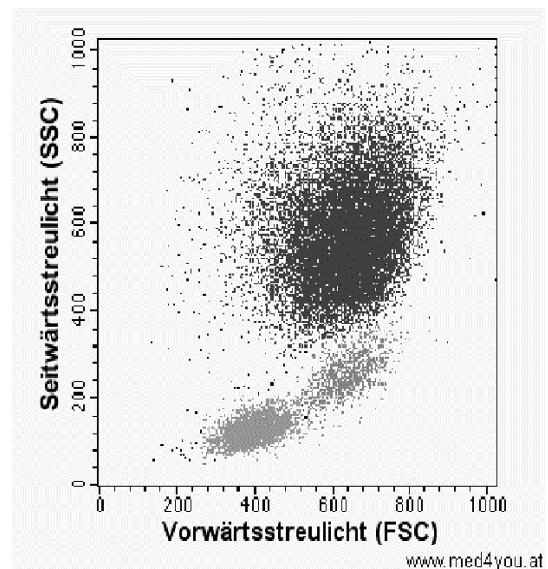


Fig. M4: Streulicht- oder Scatterplot. Jeder abgebildete Punkt entspricht einem Messwert.

3.2. Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS)

Trifft der monochromatische Laserstrahl auf ein Molekül des Fluoreszenzfarbstoffes, werden Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Anschließend fallen die Elektronen wieder auf ihr ursprüngliches Energieniveau zurück und emittieren überschüssige Energie in Form von Photonen.

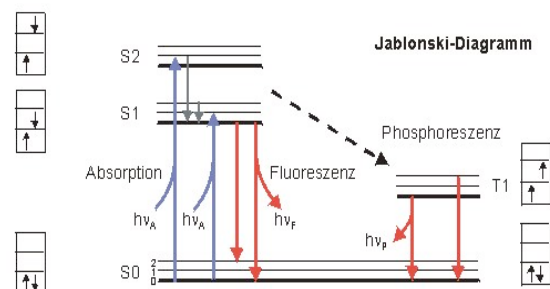


Fig. M5: Darstellung der Fluoreszenz im Jablonski-Schema. Die Pfeile in den Kästchen geben die Orientierung der Elektronenspins, die Kästchen und die Querlinien die Energieniveaus der Elektronen an.

Diese Photonenstrahlung wird von einem Photodetektor (ein sogenannter Photomultiplier) erfasst, der einen elektrischen Impuls erzeugt.

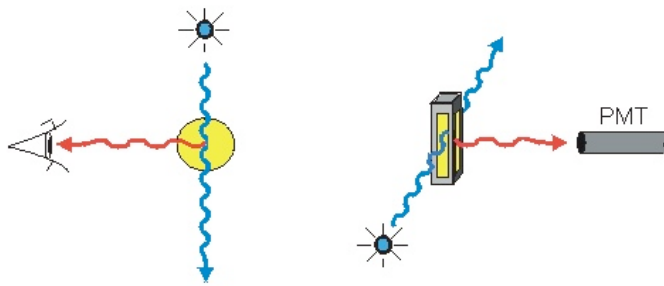


Fig. M6: Auslesen der Fluoreszenz: links: durch direkte Ansicht, rechts: durch Aufnahme und Verstärkung im Photomultiplier (PMT).

Durch die zwei Parameter FSC und SSC ist es möglich, Zellpopulationen zu definieren. Die Fluoreszenzintensität als dritter Parameter ermöglicht die Identifizierung der Population durch Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern oder mit Farbstoffen. Durch Setzen eines Zielbereichs (gate) um die Zellpopulation wird diese in Echtzeit bezüglich der Fluoreszenzintensität analysiert, das Intensitätsprofil kann als Häufigkeitshistogramm dargestellt werden. Zur Quantifizierung werden FITC-markierte Fasern (microbeads) mit definierten Bindungsstellen verwendet. Durch Regressionsanalyse kann dann aus der mittleren Fluoreszenzintensität die durchschnittliche Rezeptordichte einer Zelle ermittelt werden.

3.3. Geräteaufbau

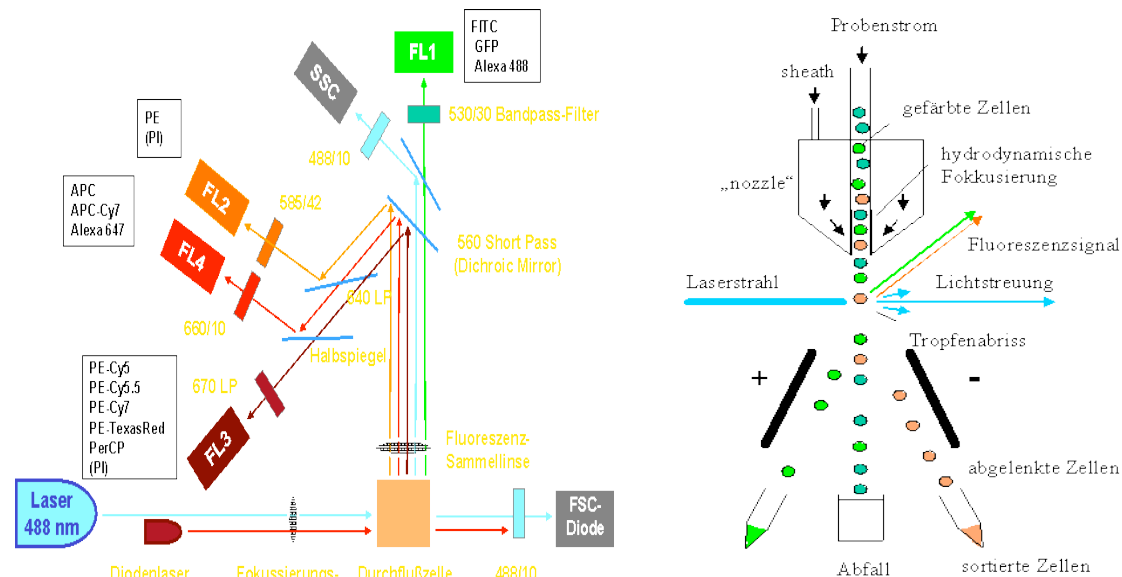
Das typische Durchflusszytometer besteht aus drei funktionellen Einheiten:

- Einer Lichtquelle (meist ein Argon-Laser mit 488 nm) mit Messkammer und optischer Einheit,
- einem hydraulischen System, welches die Passage der Partikel regelt,
- einem Computer, der die elektrischen Signale sammelt und auswertet.

Die Hauptanwendung der FACS-Analyse besteht jedoch in der Erfassung bestimmter Eigenschaften der zu untersuchenden Zellen wie Zelltyp, Präsentation von Rezeptoren oder Antigenen auf der Zelloberfläche, Enzymaktivitäten oder DNA-Gehalt. Die Zellen werden hierbei mit monoklonalen Antikörpern, die direkt oder über sekundäre Antikörper an spezifische Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, markiert.

Somit können quantitative Aussagen sowohl über Oberflächenmoleküle, als auch über intrazelluläre Proteine getroffen werden. Die farbstoffgebundene Ladung ermöglicht zudem eine Sortierung der Zellen [73] (Fig. M7).

Fig. M7: Links die schematische Darstellung des Strahlenganges eines BD-FACScan-Gerätes,



rechts die des Zell-Sortiervorgangs

Dieses Signal verhält sich proportional zu der Menge an entstandener Strahlung und somit auch proportional zur Menge an gebundenem Antikörper [74]. Die Messergebnisse werden dann graphisch in einem sog. Dot Plot dargestellt (Fig. M8).

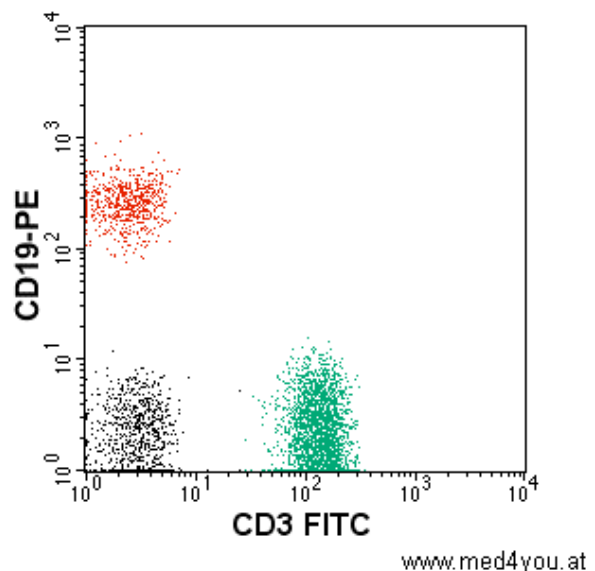


Fig. M8: Dot-Plot von Zellen mit zwei verschiedenen Fluoreszenzmarkierungen und einer unmarkierten Population

3.4. Durchflusszytometrische Messung (FACS) von Thrombozyten

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können verschiedene Teilsequenzen der Thrombozytenaktivierung analysiert werden. Die Durchflusszytometrie ist geeignet zur Untersuchung der thrombozytären Formänderung, thrombozytärer Antigene wie oberflächengebundene Proteine oder Membranlipide und Markerproteine des Aktivierungszustandes der Thrombozyten [76]. Zur Durchführung der durchflusszytometrischen Charakterisierung der Thrombozyten wurde ein modifiziertes Protokoll nach Shattil und Mitarbeitern eingeführt [77], das derzeit als Standardmethode in der thrombozytären Einzelzell-Analyse [78] gilt. Die Methode besitzt den Vorteil, dass keine Lyse der Erythrozyten erforderlich ist. Zudem müssen keine Waschschrte durchgeführt werden und nach der Fixierung sind die Proben mehrere Stunden stabil [79].

3.5. Durchführung der FACS-Messungen

Die Proben wird in einem FACScan Durchflusszytometer unter Einsatz der Cell Quest Software 3.1 (Becton Dickinson) analysiert. Dabei werden definierte Proteine der Zellen mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper detektiert. Die Zählung der Fluoreszenzereignisse wird für jede Probe bis $n=10.000$ fortgeführt und danach die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensität und Lichtstreuung berechnet.

Die Probenvorbereitung richtet sich nach dem jeweiligen Protein, das untersucht wird. Drei thrombozytäre Proteine und ein Membranlipid werden hier funktionell untersucht:

- der Fibrinogenrezeptor insgesamt (GPIIb/IIIa, aktiviert und nichtaktiviert der Nachweis des an den GP IIb/IIIa gebundenen Fibrinogens erfolgt mit Anti-Fibrinogen-AK),
- PAC1 (nur gegen aktivierte Fibrinogenrezeptor, d. h. aktiviertes GPIIb/IIIa gerichtet, das noch kein Fibrinogen gebunden hat),
- CD62 (P-Selektin, ein thrombozytärer Sekretionsmarker. Eine erhöhte Bindung von Anti-CD62P weist auf die irreversible Degranulation (alpha-Granula) der im Blut befindlichen Thrombozyten hin),

- Annexin V (ein 35-36 kDa Ca^{2+} -abhängiges Phosphatidylserin- und Phosphatidylethanolamin-bindendes Protein, das an diese bei der Aktivierung der Thrombozyten exponierten Membranlipide bindet). Im Verlauf der Gerinnungsbildung wird PS (und in geringerem Maße auch PE), überwiegend ein Phospholipid der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran, in die dem äußerem Extrazellularraum zugewandte, äußere Membranschicht transloziert. Annexin V bindet mit einer hohen Affinität an Phosphatidylserin und somit an Zellen mit extrazellulärem PS, so dass aktivierte Plättchen mittels FITC-(Fluorescein-isothiocyanat)-gekoppeltem Annexin-V bezüglich der Membranlipid-Exposition von nicht aktivierten unterschieden werden.

Als Referenzwerte werden eine nicht aktivierte PRP-Probe und eine Kontrollprobe eines hämostatisch gesunden Probanden verwendet.

3.5.1. Aktivierter Fibrinogenrezeptor (PAC1)

Ein FITC-markierter anti-PAC-1-Antikörper wird zur Detektion des aktivierten Fibrinogenrezeptors verwendet. 10 µl PRP werden mit 170 µl HEPES-Puffer verdünnt und mit 20 µl Antikörper-Stammlösung inkubiert. Die Proben werden entweder mit ADP oder TRAP im Konzentrationsbereich zwischen 0 bis 10 µM aktiviert. Nach 10 Minuten werden die Proben mit 200 µl einer zweiprozentigen Formaldehydlösung fixiert und nach 24 Stunden bei 4° C mit CellWash (Becton Dickinson) gewaschen, bei 650 g für 5 min zentrifugiert und auf 500 µl aufgefüllt.

3.5.2. Fibrinogen-Bindungskapazität (Anti-Fibrinogen) und P-Selektin (CD62P-Antigen) unter TRAP und ADP-Stimulation

10 µl PRP werden verdünnt mit 170 µl HEPES-Puffer und mit 10 µl anti human Fibrinogen Chicken-Antikörper, FITC konjugiert (Fibrinogenbindung) bzw. 10 µl anti human CD 62 P (P-Selektin), FITC konjugiert, versetzt und 20 µl der jeweiligen TRAP oder ADP-Lösung zugesetzt. Eine Kontrolle wird zur Bestimmung des Basiswertes ohne Aktivator angesetzt. Die Ansätze werden nach leichtem Mischen 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Dann folgt die Fixation durch Zugabe von 200 µl 2%-igem Formaldehyd für 1 h bei 4° C. Nach Abziehen und

Waschen der Probe mit 500 µl Hepes-Puffer (Zentrifugation 650 g, 5 Minuten) und Resuspension in 500 µl Hepes-Puffer wird die Messung im Durchflusszytometer durchgeführt.

3.5.3 Annexin V und P-Selektin (CD62P) unter N7-Stimulation

Zu 125 µl PRP werden 375 µl HEPES-Puffer [20 mM] mit CaCl_2 [5 mM] gegeben. rFVIIa wird zum Erreichen der Endkonzentrationen 0, 50, 100, 200, 500, 1000 und 2000 U/ml hinzugefügt. Nach 10 min Inkubation bei 37 Grad C wird 1 ml HEPES-Puffer dazugegeben. Nach Entnahme eines 100 µl-Aliquots werden 5 µl FITC-markierter anti-Annexin-V-Antikörper für 15 Minuten Inkubation im Dunklen addiert. Nach Zugabe von 400 µl HEPES-Puffer erfolgt die Messung.

Zur Auswertung wird die zunächst die Probe ohne FVIIa zur Festlegung des unteren Referenzbereichs festgelegt. Die Messergebnisse der anderen Proben werden als Prozent der gemessenen Ereignisse (Fluoreszenzsignale) ausserhalb dieses Referenzbereichs ausgedrückt.

Ergebnisse

1. Dosis-Wirkungskurven für die Thrombingenerierung unter rFVIIa bei gesunden Normalpersonen

1.1. Endogenes Thrombinpotential (ETP)

Die Probanden waren gesunde Männer zwischen 20 und 37 Jahren ohne antihämostatische Medikation in den letzten 4 Wochen. Für die Probandengruppe wurde das PRP wie oben beschrieben aus Citratblut gewonnen. Das endogene Thrombinpotential für die Dauer der Messung (ETP), die maximale Thrombinbildungsgeschwindigkeit (PEAK), die Latenzzeit (LT) und die Zeit vom Start bis zum Erreichen des PEAK (TTP) wurden für jede Messung errechnet. Die Thrombinbildung wurde für die Dosen 50, 100, 200, 500 und 1000 U rFVIIa/ml gemessen. Diese Messwerte wurden zur Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung, ihrer Charakteristik, und der interindividuellen Variationen für die o. g. Parameter bei gesunden Normalpersonen gewonnen. FVIIa wurde als einziger Gerinnungsauslöser eingesetzt.

1.1. (a) Endogenes Thrombinpotential (ETP), in-vitro-Inkubation (Spiking) von PRP mit rFVIIa

Die ETPs der Low-Responder-Probanden zeigten eine dosisabhängige Zunahme und erreichten schnell ein niedriges ETP bei niedrigen rFVIIa-Konzentrationen (Fig. 1.1 a), im Gegensatz zum Peak, bei dem die Dosis-Wirkungsbeziehung zu den anderen Probanden keinen Unterschied aufwies (Fig. 1.2 a,b). Das ETP der anderen Probanden („Responder“) zeigte eine sigmoide Konzentrations-Wirkungskurve mit zunehmenden FVIII-Konzentrationen (Fig. 1a), für den PEAK wurde ein ähnliches Muster beobachtet (Fig. 2a). Das ETP der Normal-Responder nahm exponentiell zu von 50 bis 200 U/ml, höhere Konzentrationen ergaben ein Wirkungsplateau vergleichbar mit den ETPs, die von gesunden Probanden erreicht wurden (Fig. 1.1 a).

Für die Hälfte der Probanden begannen ETP und PEAK bei Konzentrationen ab 50 U/ml zuzunehmen, für die andere Hälfte erst ab 100 U/ml. Beide Gruppen unterschieden sich deutlich in der Steilheit des dosisabhängigen Zunahme dieser

Parameter. Es gab weiterhin keine Korrelation zwischen der ersten rFVIIa-Dosis, bei der Thrombinbildung überproportional zu steigen begann und der Steilheit der Dosis-Wirkungskurve.

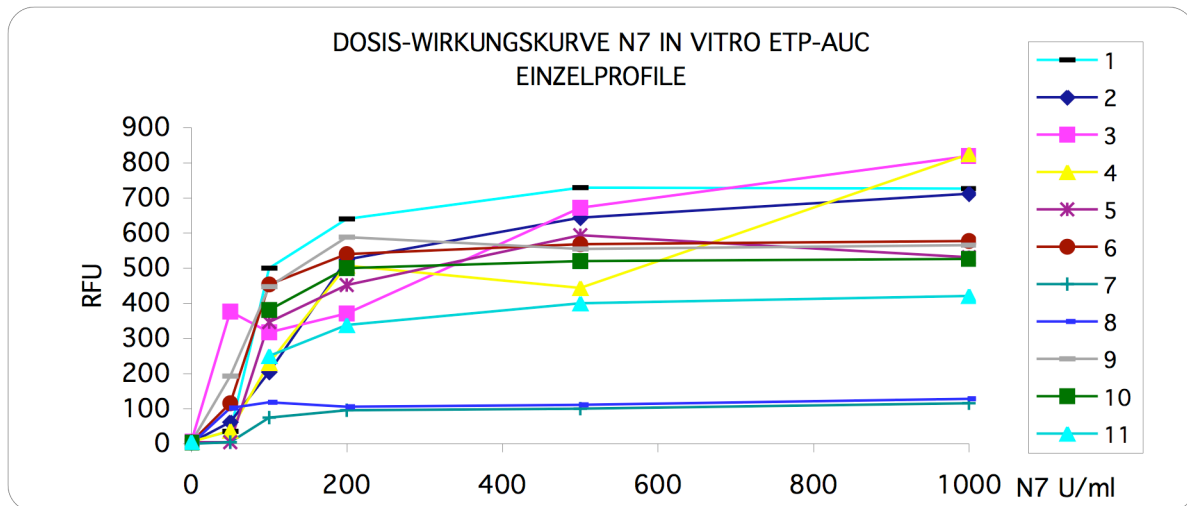
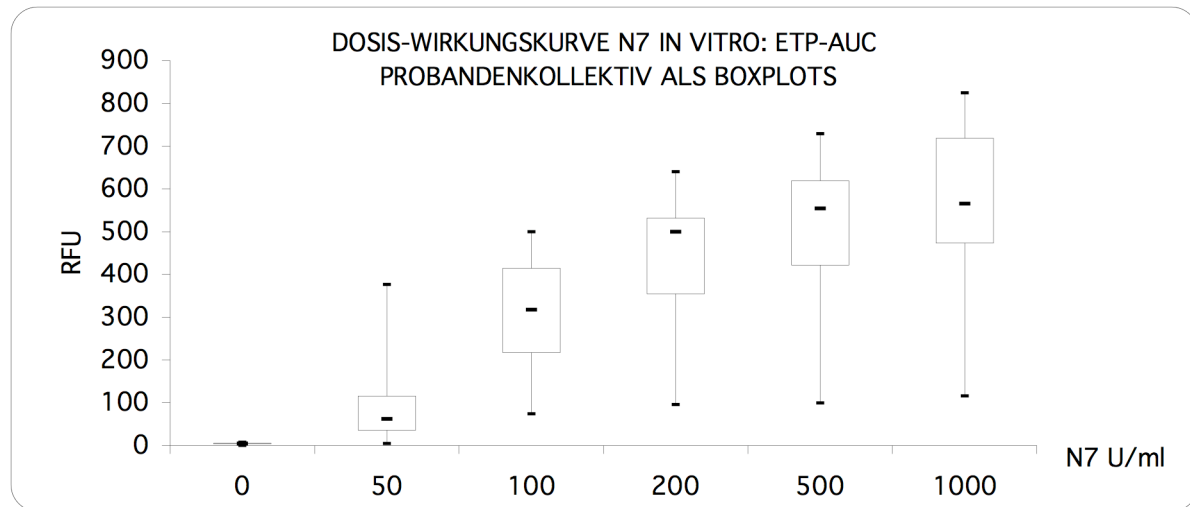


Fig. 1.1. (a): Das ETP wurde über die Messlaufzeit von 66 min erfasst. Das PRP stammte von 11 Probanden, darunter neun mit deutlich erkennbarer Reaktion auf rFVIIa (Responder). Zwei davon erreichten niedrige Absolutwerten (Low-Responder, Nr. 7 und 8, ETPs um 100 RFU, im der Grafik nahe an der x-Achse verlaufend). Die Grafik zeigt das Dosis-Wirkungs-Profil für jeden Probanden separat.

Von den 11 Probanden sprachen 2 nicht oder nur in sehr geringem Umfang auf rFVIIa an (sog. Low-responder). Die Probanden erreichten eine Plateauphase spätestens ab 200 U/ml rFVIIa. Die Streuung innerhalb der Responder lag bei ca. 100 %.

1.1. (b) Die Veränderung des ETP des Probandenkollektivs unter rFVIIa in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)



ETP	N7 U/ml	0	50	100	200	500	1000
	Q1	3,78	35,55	217,36	354,42	422,05	473,69
	MIN	0,00	4,57	74,30	95,40	99,70	115,40
	MEDIAN	4,67	62,22	317,70	499,57	554,40	565,51
	MAX	7,82	376,80	499,66	640,44	728,67	824,92
	Q3	5,11	115,54	414,43	531,89	618,81	718,85

Fig. 1.1. (b): Die Werte sind als Boxplots (Median, Maximum, Minimum, 25 %- und 75%-Quartil des Wertebereichs aus 11 Probanden, siehe auch Fig. 1.2.b) dargestellt. Im Bereich der Wirkschwelle von 50 U/ml variieren die Einzelwerte am stärksten und liegen im Mittel bei 1/5 des Sättigungsniveaus.

Unter den ETP-Normalrespondern fanden sich große interindividuelle Variationen (ca. 100 %) in der Höhe der Plateauniveaus, die Spanne lag zwischen 400 und 700 RFU (Fig. 1a, 1b). Der Anfang dieser Plateauphase lag für ETP und PEAK bei 100-200 U rFVIIa/ml. Der Plateauverlauf wies übereinstimmende Charakteristiken auf, entweder nahmen die Parameter mit steigender Dosis nicht weiter zu, oder die weitere Zunahme wurde sehr viel geringer als im Bereich des stärksten Zunahme bei steigenden rFVIIa-Konzentrationen (sigmoide Charakteristik). Es konnte ebenfalls keine Korrelation zwischen der ersten rFVIIa-Dosis mit überproportionaler Steigerung der TGT-Parameter ETP und PEAK und dem Niveau des Plateaus gezeigt werden [Fig. 1.1. (a), (b) und 1.2. (a), b)].

1.2. Maximale Thrombinbildungsgeschwindigkeit (PEAK)

Im Gegensatz zu den ETP-Werten (Gesamtthrombinaktivität) gab es keinen Low-Responder bezüglich der PEAK-Werte, welche sich bei Normal- und Low-Respondern mit der FVIIa-Konzentration gleichermaßen änderten. Die erste effektive Konzentration, die eine deutlich Änderung des PEAK bewirkte, war wie beim ETP 50 U/ml (9x) bzw. 100 U/ml (2x). Die Variabilität des rFVIIa-abhängigen PEAK-Anstiegs der Thrombinbildung war größer als für das ETP [Fig. 1.1. (b) und 1.2. (b)]. Es konnte aber keine Korrelation zwischen der Konzentrationsabhängigkeit, d. h. der ersten effektiven PEAK-Zunahme und der Höhe des Plateaus dargestellt werden. [Fig. 1.2. (a)].

1.2. (a) Spiking von PRP mit rFVIIa, Thrombinbildung, maximale Bildungsgeschwindigkeit (PEAK)

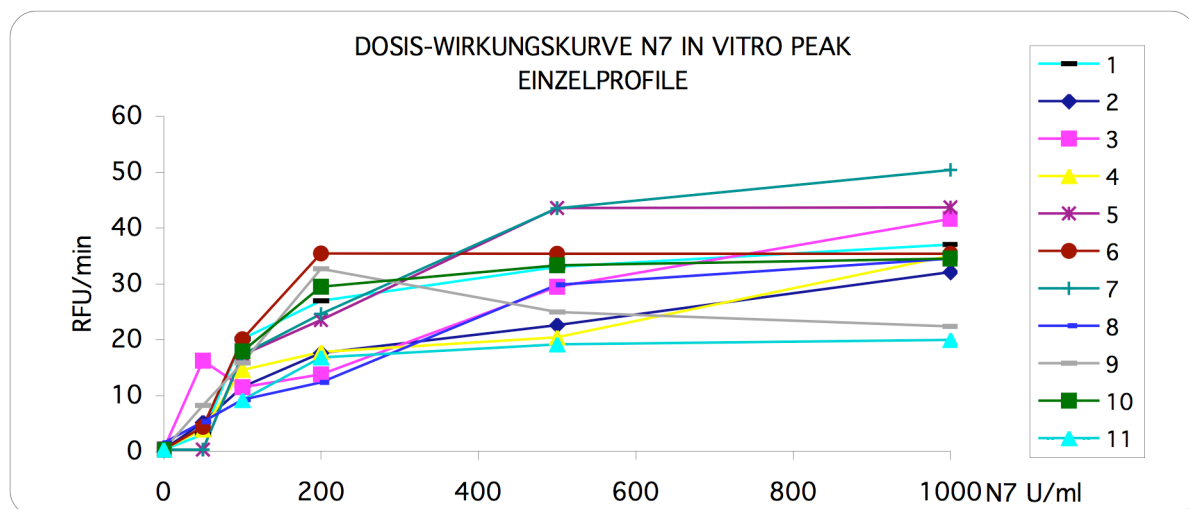
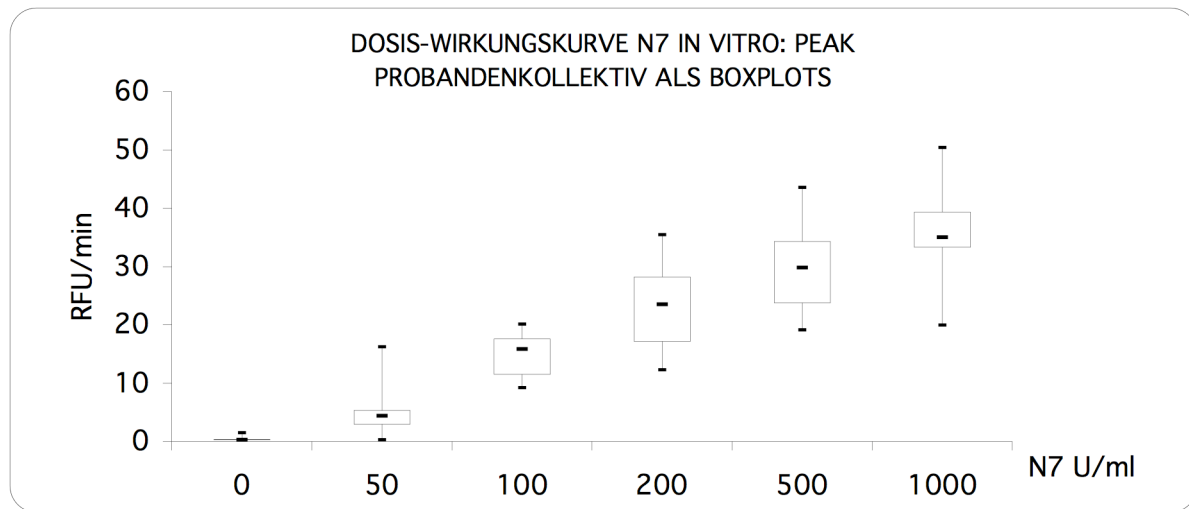


Fig. 1.2. (a): Das Diagramm zeigt 11 Probanden, die im Gegensatz zum ETP nicht in Responder und Low-Responder unterteilt werden können. Das Plateau wird zwischen 200 und 500 U/ml rFVIIa erreicht. Die Streuung liegt innerhalb des Kollektivs bei bis zu 250%. Im Vergleich zum ETP abgeflachte sigmoide Charakteristik der Dosis-Wirkungskurven. Die ETP-Low-Responder waren hier unauffällig und im Bereich der anderen Probanden.

1.2 (b) Die Veränderung des PEAK des Probandenkollektivs unter rFVIIa in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU)



PEAK	N7 U/ml	0	50	100	200	500	1000
	Q1	0,27	2,96	11,49	17,18	23,77	33,29
	MIN	0,25	0,30	9,20	12,30	19,15	19,93
	MEDIAN	0,30	4,38	15,83	23,51	29,80	35,03
	MAX	1,50	16,21	20,12	35,42	43,54	50,40
	Q3	0,33	5,30	17,58	28,20	34,32	39,34

Fig. 1.2. (b): Die Werte sind als Boxplots dargestellt. Der darin verwendete Median ist resistenter als der Mittelwert gegen Ausreißerwerte, da er den mittleren Wert der in einer Rangliste geordneten Werte (ungerade Anzahl) bzw. den Mittelwert der beiden mittleren Werte (gerade Anzahl) darstellt. Die gleichmäßigen Abstände auf der x-Achse beim Boxplot erzeugen gegenüber der linearen x-y-Darstellung eine Streckung im Anfangsbereich und eine Stauchung im Endbereich der x-Achse. Bereiche starker y-Veränderung bei kleinen x-Veränderungen werden so deutlicher dargestellt.

Der Aufstieg zum Plateaubereich mit steigender N7-Konzentrations ist weniger steil als für das ETP, der PEAK-Wert für die höchste Konzentration ist wie beim ETP ca. neunmal höher als für die niedrigste. Die sigmoide Dosis-Wirkungs-Charakteristik ist im Vergleich zum ETP flacher verlaufend.

1.3. (a) Spiking von PRP mit rFVIIa, Thrombinbildung, Latenzphase oder LAG TIME (LT)

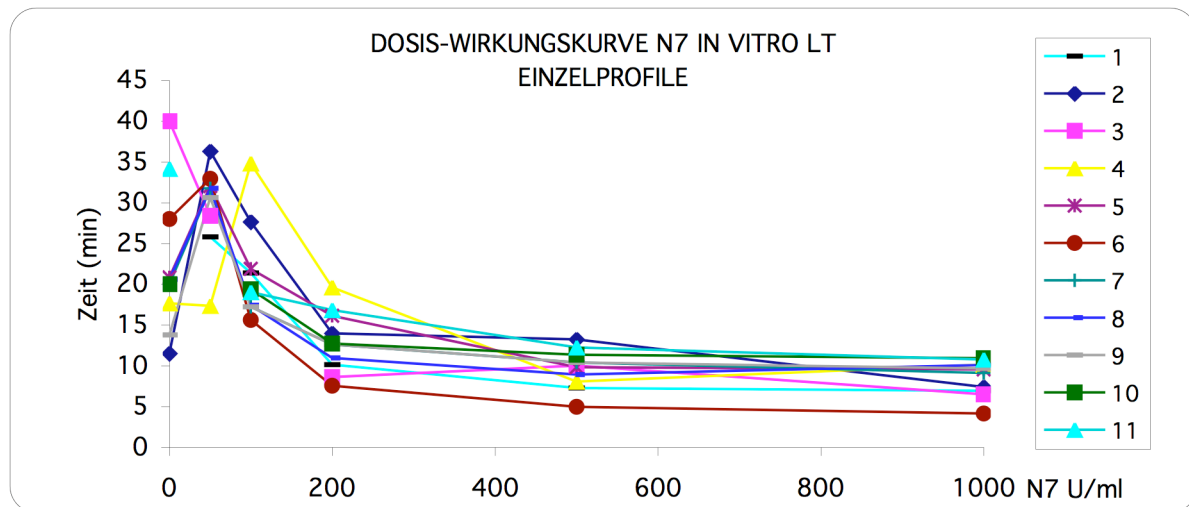
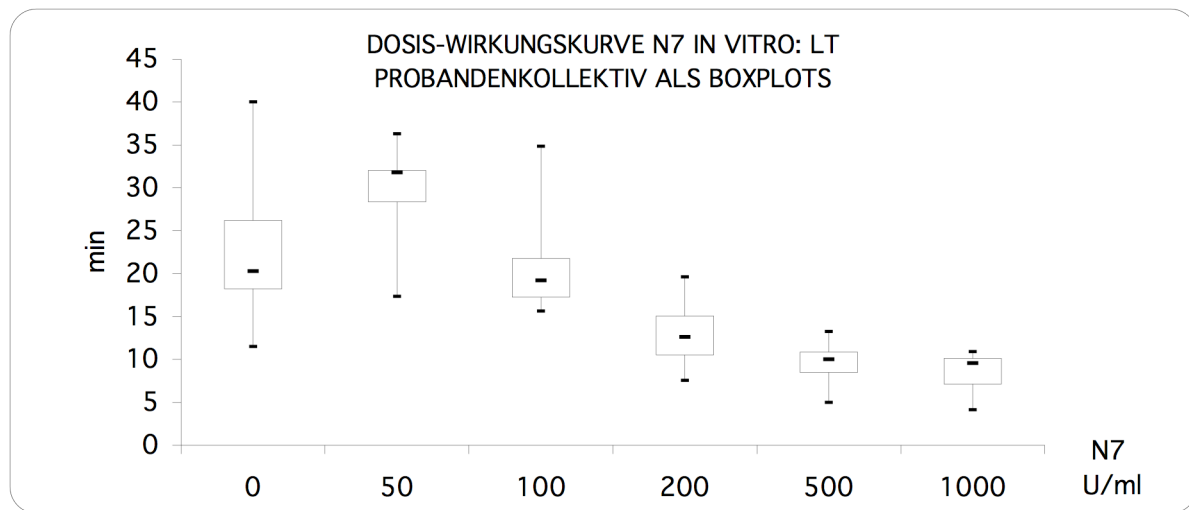


Fig. 1.3. (a): 11 Probanden, deren Wertestreuung bei max. 200 % unter 200 U/ml, darüber unter 100 % liegt. Der Wert ohne N7 in der Probe (0 U/ml) hat keine Bedeutung, da das entsprechende ETP sich nahe bei Null bewegt. Die stärkste Abnahme liegt im niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 50 und 200 U/ml.

Die LT zeigt einen für alle Probanden ähnlichen Verlauf mit einer schnell eintretenden Verkürzung, die bei supratherapeutischen Konzentrationen über 200 U/ml nicht mehr gesteigert werden kann. Die größten Abweichungen vom Median („Ausreißer“) finden sich bei den niedrigen Konzentrationen [Fig. 1.3. (a), 1.3. (b)].

1.3. (b) Die Veränderung der LT unter rFVIIa in Minuten



LAG TIME	N7 U/ml	0	50	100	200	500	1000
	Q1	18,25	28,38	17,27	10,55	8,50	7,16
	MIN	11,50	17,33	15,64	7,54	4,99	4,15
	MEDIAN	20,30	31,77	19,20	12,62	10,02	9,56
	MAX	40,00	36,30	34,84	19,60	13,25	10,92
	Q3	26,21	32,04	21,77	15,06	10,89	10,13

Fig. 1.3. (b): Stärkste Abnahme der LT von 50 U/ml N7 an bis 200 U/ml. Eine weitere Erhöhung der Dosis bringt nur noch eine leicht größere Reduktion der LT auf ca. 1/3 des Wertes der niedrigsten Konzentration bei abnehmender Variationsbreite. Der Wert ohne N7 in der Probe (0 U/ml) hat keine Bedeutung, da das entsprechende ETP sich nahe bei Null bewegt.

Die LT-Werte von 11 Probanden liegen im Gegensatz zum ETP und PEAK in ihren Verläufen insgesamt enger beieinander. Dies wird sowohl in den Einzelprofilen als auch durch die geringeren Spannbreiten (Abstand der Maxima und Minima vom Mittelpunkt) der Boxplots angezeigt, die ab 200 U/min rFVIIa wie der LT-Median nur noch mit geringgradiger Verkürzung reagiert.

1.4. (a) Spiking von PRP mit rFVIIa, Thrombinbildung, TIME TO PEAK (TTP)

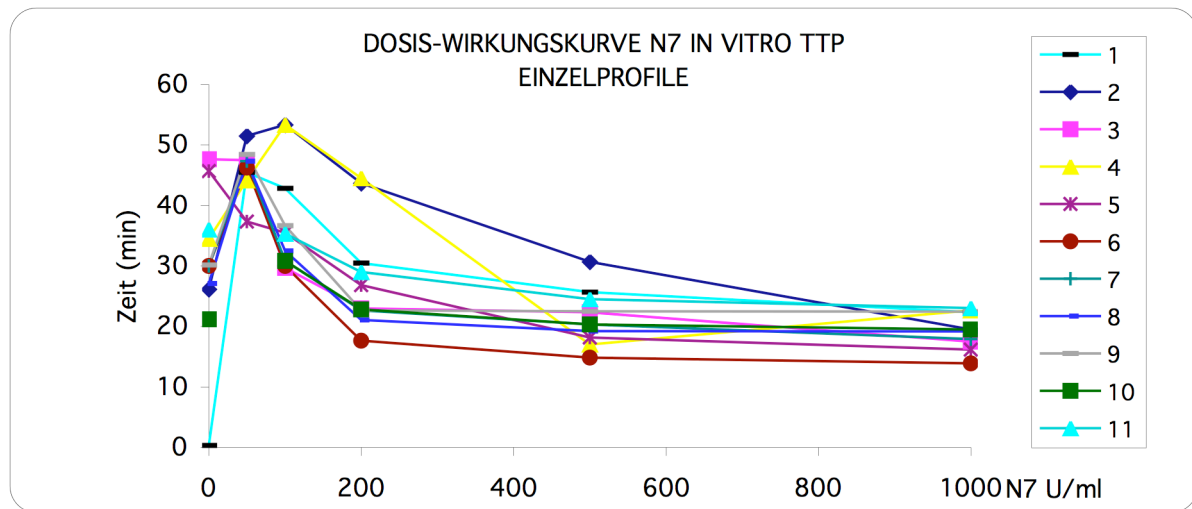
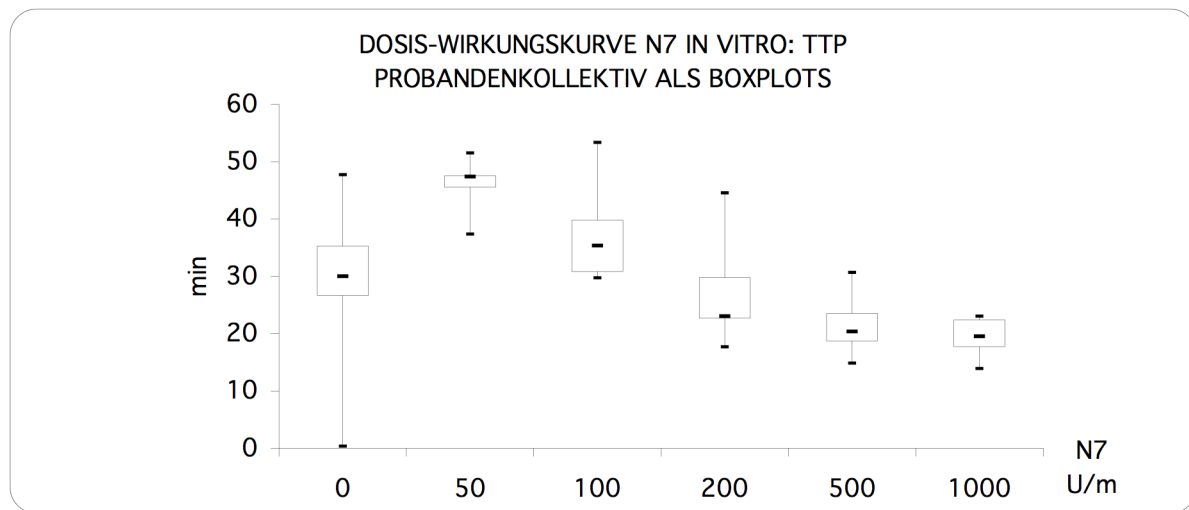


Fig. 1.4. (a): Das Diagramm zeigt 11 Probanden, die in ihrer Abnahme mit steigender rFVIIa-Konzentration eng beieinander liegen. Zwei Probanden sprechen bezüglich der steigenden Konzentrationen verzögert an. Die Streuung der anderen Probanden liegt unter 50 %. Der Wert ohne N7 in der Probe (0 U/ml) hat keine Bedeutung, da das entsprechende ETP sich nahe bei Null bewegt. Die stärkste Abnahme liegt im niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 50 und 200 U/ml. Darüber hinaus sind nur noch geringe weitere Abnahmen messbar.

1.4. (b) Die Veränderung der TTP unter rFVIIa in Minuten



TIME TO PEAK	N7 U/ml	0	50	100	200	500	1000
	Q1	26,64	45,50	30,83	22,67	18,69	17,71
	MIN	0,33	37,33	29,67	17,67	14,83	13,90
	MEDIAN	30,00	47,33	35,33	23,00	20,33	19,50
	MAX	47,67	51,50	53,33	44,50	30,67	23,02
	Q3	35,25	47,50	39,75	29,75	23,50	22,39

Fig. 1.4. (b): Stärkste TTP-Abnahme von 50 U/ml N7 an bis 200 U/ml, der Sprung von 50 auf 100 und von 100 auf 200 U/ml ist gleichmäßiger. Eine weitere Erhöhung der Dosis bringt nur noch eine leicht größere Reduktion der LT auf ca. 1/2 des Wertes der niedrigsten Konzentration bei abnehmender Variationsbreite. Der Wert ohne N7 in der Probe (0 U/ml) hat wie bei der LT keine echte Relevanz, da das entsprechende ETP sich nahe bei Null bewegt.

Bei der TTP ist die Charakteristik der Einzelprofile und der Boxplots ähnlich der der LT, die relative Spannbreite der Werte von der niedrigsten bis zur höchsten N7-Konzentration aber kleiner als bei der LT [2fach gegenüber 4fach; Fig. 1.3. (a), 1.3. (b), 1.4. (a), 1.4. (b)]. Es treten zwei träge reagierende Profile auf, die aber bezüglich der anderen TGT-Parameter nicht aus den anderen Probanden herausfallen und auch nicht mit den zwei ETP-Low-Respondern identisch sind [Fig. 1.4. (a), 1.4. (b)]. Die TTP sinkt zwischen 100 und 200 U/ml schwächer als die LT.

2. Einfluß des TF-neutralisierenden Antikörpers (TF-Ab) auf die rFVIIa-abhängige Thrombingenerierung

Das PRP wurde wie für das vorangegangene Normalkollektiv unter *Methoden* beschrieben gewonnen. Die Thrombingenerierungsparameter ETP, PEAK, LT und TTP wurden wie dort beschrieben errechnet, sowohl für die Einzelprofile wie auch die Boxplotdarstellungen. Die Thrombinbildung wurde für die Dosen 50, 100, 200, 500 und 1000 U rFVIIa/ml gemessen. Diese Messwerte wurden zur Ermittlung des Einflusses der Gerinnungsaktivierung über den TF-FVIIa-Komplex (sog. „extrinsischer“ Weg) auf die Dosis-Wirkungsbeziehung, ihre Charakteristik, und die interindividuellen Variationen für gesunde Normalpersonen gewonnen. FVIIa wurde als einziger Gerinnungsauslöser eingesetzt.

Die PRP-Aliquots wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen TF (American Diagnostica Inc.; Abk. AD) in einer Konzentration von 50 mg/ml für 15 min bei Raumtemperatur (RT) vorinkubiert. Die darauf folgende Thrombinbildungsmessung wurde durchgeführt wie für das Normalkollektiv im vorhergehenden Abschnitt beschrieben. Die TF-Ab-Konzentration wurde 1000fach größer gewählt als die normale TF-Konzentration im Blut [6]. Herstellerseitig (AD) wurde für diese Antikörperkonzentration bereits eine >90%ige Inhibition und Neutralisation von aktivem TF nachgewiesen [85].

Die Vorinkubation des PRP mit einem TF-neutralisierenden Antikörper erhöhte die niedrigste rFVIIa-Dosierung um die Thrombinbildung deutlich zu aktivieren von 50 auf 100 U/ml. Die weitere ETP- bzw. PEAK-Zunahme mit steigender rFVIIa-Konzentration war weniger stark ausgeprägt und der Übergang in die Plateauphase weniger scharf abgegrenzt [Fig. 1.1. (b), 1.2. (b), 2. (a), 2. (b)].

2. (a) ETP-Veränderungen unter rFVIIa in Gegenwart eines TF-neutralisierenden Antikörpers in RFU

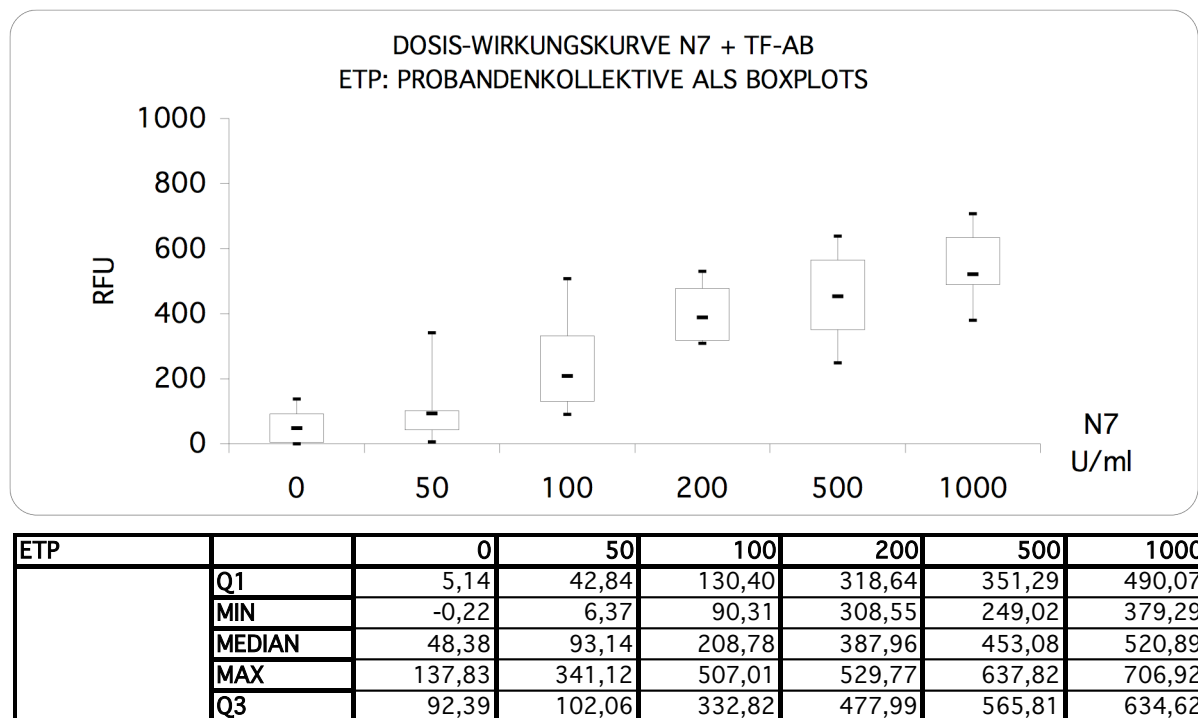
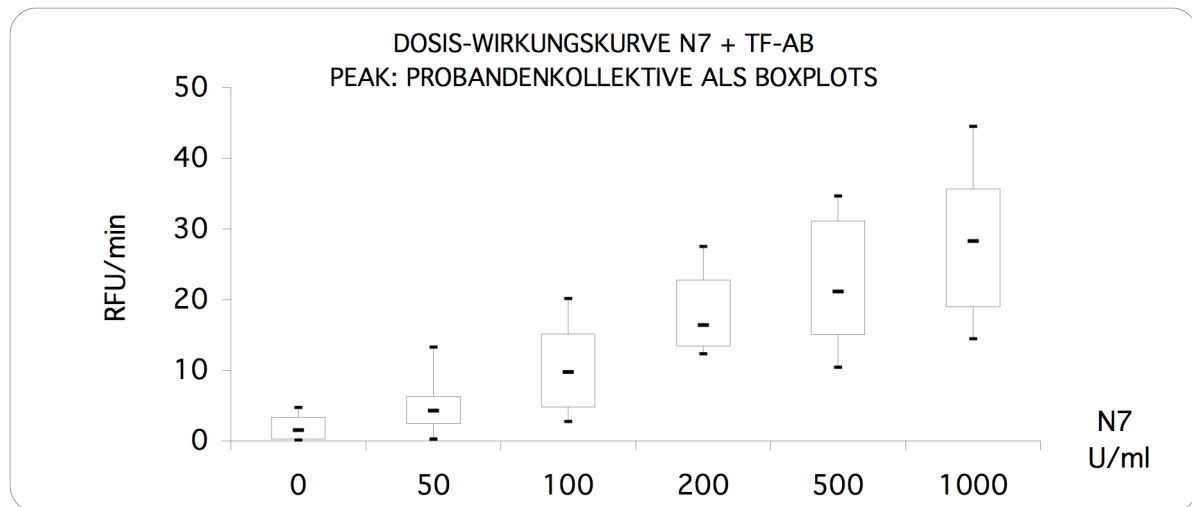


Fig. 2. (a): Die Werte sind als Boxplots (Median, Maximum, Minimum, 25 %- und 75%-Quartil des Wertebereichs aus 11 Probanden) dargestellt. Die Reduktion des ETP in Gegenwart eines TF-neutralisierenden Antikörpers liegt zwischen 20 auf 30% [Fig. 1.1. (b)]. Die Charakteristik der beiden Kurven mit und ohne Antikörper ist übereinstimmend mit abgesenkter Plateauphase in Gegenwart des Antikörpers. Der Sättigungsbereich beginnt bei 200 U/ml N7, ab hier bringt eine 5-fache Stimuluserhöhung nur noch ein 34 % höheres Thrombinpotential. Die Voraktivierung (0-Wert) ist niedrig.

Die erforderliche rFVIIa-Konzentration, um das ETP-Wirkplateau zu erreichen, lag unter Inkubation mit TF-Ab zwischen 500-1000 U/ml und damit höher als 200 U/ml ohne TF-Ab. Die ETP-Reduktion ging mit steigenden rFVIIa-Konzentrationen auf 33 %, bei supratherapeutischen Konzentrationen auf 25 % bzw. 6 % für die höchste Konzentration zurück [Fig. 1.1 (b) und 2. (a)].

2. (b) PEAK-Veränderungen unter rFVIIa in Gegenwart eines TF-neutralisierenden Antikörpers in RFU/min

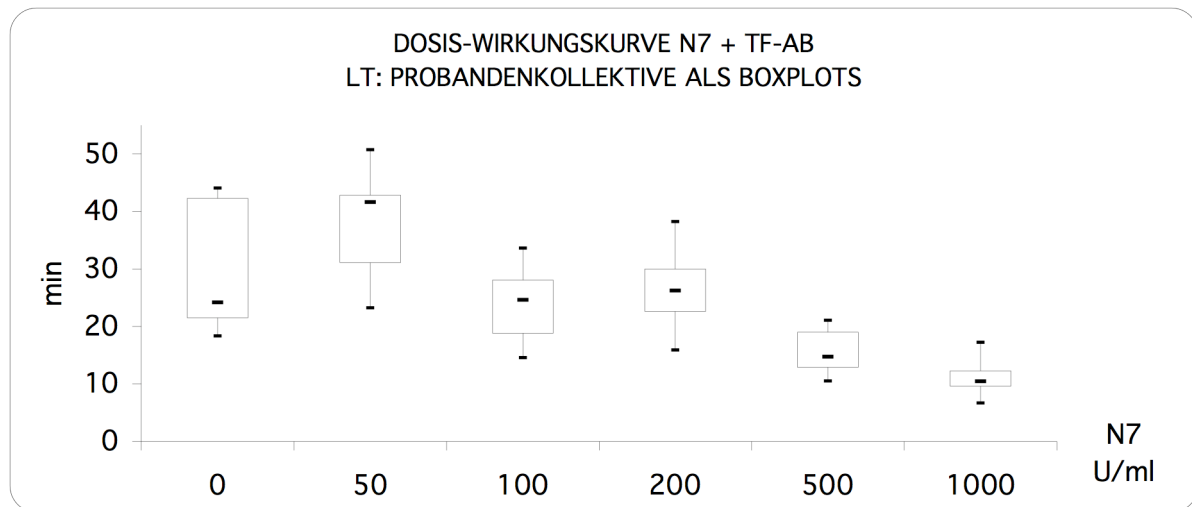


PEAK		0	50	100	200	500	1000
	Q1	0,30	2,48	4,85	13,46	15,06	18,99
	MIN	0,13	0,27	2,77	12,32	10,43	14,47
	MEDIAN	1,54	4,31	9,75	16,38	21,14	28,27
	MAX	4,76	13,28	20,17	27,49	34,67	44,49
	Q3	3,41	6,26	15,12	22,75	31,13	35,63

Fig. 2. (b): Die Reduktion des PEAK in Gegenwart eines TF-neutralisierenden Antikörpers liegt bei 30% [Fig. 1.2. (b)]. Die Charakteristik der beiden Kurven ist übereinstimmend mit abgesenkter Plateauphase in Gegenwart des Antikörpers. Der Sättigungsbereich beginnt bei 200 U/ml N7, ab hier bringen 500 % Stimuluserhöhung eine um weniger als 50% höhere maximale Thrombinbildungsgeschwindigkeit.

Das maximale PEAK-Sättigungsniveau nach Inkubation mit dem Antikörper erniedrigte sich außerdem für die höchste rFVIIa-Konzentration (1000 U/ml) von 35 auf 28 RFU/min (ca. 20 %). Die Hemmwirkung des TF-neutralisierenden Antikörpers für den PEAK war am deutlichsten für sub- und niedrige therapeutisch eingesetzte Dosierungen (25-33 % relative Reduktion). [Fig. 1.2. (b), 2. (b)]. Die Veränderungen waren größer gegenüber der ETP-Reduktion.

2. (c) LT-Veränderungen unter rFVIIa in Gegenwart eines TF-neutralisierenden Antikörpers in Minuten

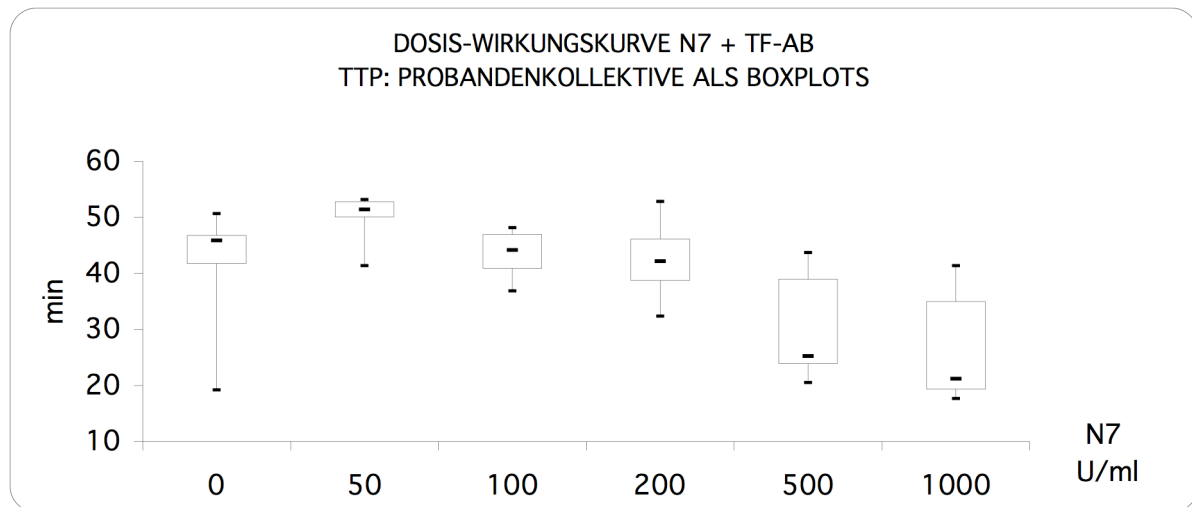


LAG TIME		0	50	100	200	500	1000
	Q1	21,53	31,09	18,83	22,60	12,89	9,63
	MIN	18,32	23,23	14,56	15,89	10,48	6,69
	MEDIAN	24,19	41,63	24,60	26,24	14,74	10,43
	MAX	44,06	50,73	33,61	38,24	21,05	17,24
	Q3	42,26	42,83	28,05	29,99	19,00	12,28

Fig. 2. (c): Die Annäherung der LT-Werte erfolgt bei der höchsten Konzentration, die relative Reduktion von der höchsten zur niedrigsten FVIIa-Konzentration auf 1/4 liegt höher als ohne TF-Ab auf 1/3 bei insgesamt verlängerten Zeiten [Fig. 1.3. (b)]. Stärkster Rückgang im niedrigen N7-Dosisbereich zwischen 50 und 100 U/ml.

Der Rückgang der LT verläuft mit zunehmenden rFVIIa-Konzentrationen ab 100 U/ml in der Präsenz von TF-Ab [Fig. 1.3. (b)] deutlich träger. Bei sonst übereinstimmender Charakteristik liegen die Medianwerte in Gegenwart des Antikörpers durchweg auf einem erhöhten Niveau, d. h. sie sind dadurch durchweg verlängert [Fig. 2. (c)].

2. (d) TTP-Veränderungen unter rFVIIa in Gegenwart eines TF-neutralisierenden Antikörpers in min



TIME TO PEAK		0	50	100	200	500	1000
	Q1	41,75	50,08	40,88	38,71	23,92	19,38
	MIN	19,17	41,33	36,83	32,33	20,50	17,67
	MEDIAN	45,83	51,42	44,17	42,17	25,25	21,17
	MAX	50,67	53,17	48,17	52,83	43,67	41,33
	Q3	46,79	52,75	46,96	46,13	38,96	34,96

Fig. 2. (d): Die TTP weist erst ab rFVIIa-Konzentrationen über 200 U/ml mit Antikörper einen stärkeren Abfall auf verglichen mit den Werten ohne TF-Ab, wo der stärkste Abfall zwischen 50 und 200 U/ml rFVIIa stattfindet [Fig. 1.4. (b)]. Die Zeiten ohne rFVIIa (0-Werte) sind ohne korrespondierendes ETP nicht verwertbar.

Die TTP unter TF-Ab reagiert träger auf steigende N7-Konzentrationen als die LT. Für die größten N7-Konzentrationen gleicht sich das Messwerteniveau dem Wert ohne Antikörper stärker als bei der LT an.

3. Der Einfluß von Trypsin-Inhibitor aus Mais (corn trypsin inhibitor, CTI) auf die Thrombinbildung unter rFVIIa

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung des sogenannten intrinsischen Reaktionsweg der Gerinnung mit der rFVIIa-abhängigen Thrombingenerierung wechselwirkt, wurde PRP mit CTI, einem 6 kD großen Inhibitorprotein aus Mais, 15 min bei RT präinkubiert. Damit wird Faktor XII in der TGT-Messung neutralisiert und die durch Faktor XIIa folgende Aktivierung von Faktor XI zu XIa und des Generierung des Tenasekomplexes (FVIIIa und IXa) aus FVIII und IX gehemmt [5]. Das PRP, ETP, PEAK, LT und TTP wurden wie für die vorangegangenen Untersuchungen gewonnen bzw. errechnet. FVIIa wurde als einziger Gerinnungsauslöser eingesetzt.

Die Vorinkubation von PRP mit CTI konnte die Thrombingenerierung nur schwach reduzieren (durchschnittlich 3,5 % Reduktion), was nicht für eine relevante Interaktion von intrinsischem Weg bzw. FXII und der rFVIIa-abhängigen Thrombinbildung unter den Versuchsbedingungen spricht.

4. Weitere klinische Untersuchungen unter Einschluss von Patienten mit Thrombozytenfunktionsstörungen

Zur weiteren Untersuchung der Anwendbarkeit des Tests wurde nach der Validierung im plättchenreichen Plasma von gesunden Normalpersonen das folgende mehrstufige Vorgehen gewählt:

→ 4.1. Untersuchung der Übertragbarkeit von Testdurchführung in PRP und deren Auswertung auf Patienten mit Thrombozytenfunktionsstörungen. Dazu wurde eine Familie mit Thrombasthenie Glanzmann mit zwei homozygoten und drei heterozygoten Mitgliedern herangezogen, die daher den Vergleich von Genetik, Testergebnis und klinischem Bild erlaubt. Zur weiteren Validierung wurden durchflusszytometrische Messungen (FACS) durchgeführt.

→ 4.2. Der Vergleich der Testergebnisse vor und nach Gabe von N7 bei einem Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann. Ziel war der Wirksamkeitsnachweis, d. h. die Überwachung der hämostatischen Wirkung der i. v.-Gabe von N7 (Monitoring) im Umfeld einer Zahnbehandlung. Auch hier wurden zum weiteren Vergleich bzw. zur Validierung FACS-Messungen mit mehreren gerinnungsauslösenden Substanzen nach etablierten Protokollen durchgeführt.

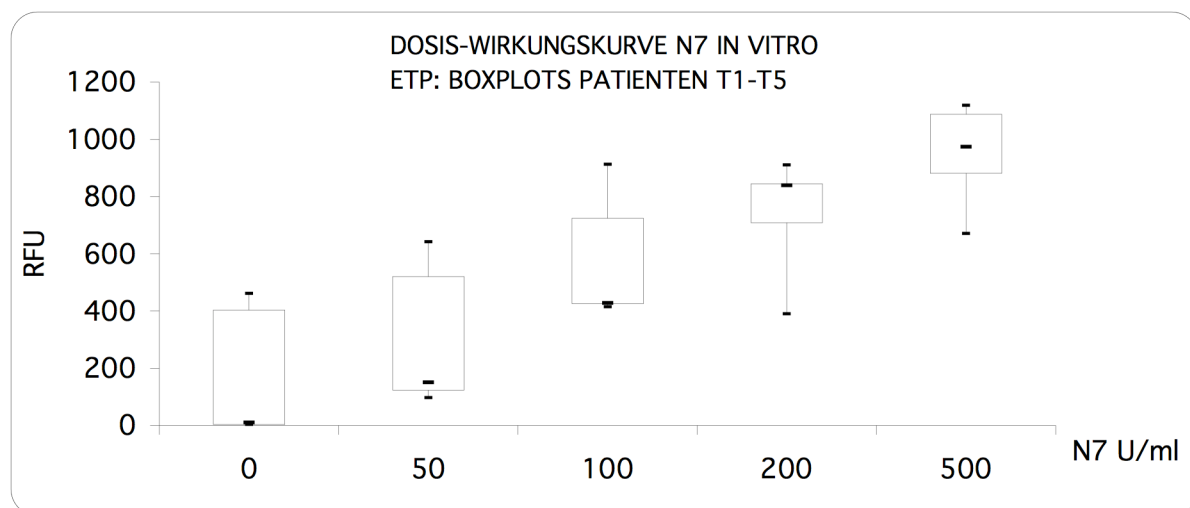
4.1. Familie T. - Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann (GT)

Die betroffene Familie besteht aus fünf (bezeichnet als T1-5) Personen (Vater 37 J., Mutter 36 J., 2 Söhne 13 und 17 J., 1 Tochter 8 Jahre). Vater und Mutter sind Cousins II. Grades, damit liegt deren genetische Übereinstimmung bei 1/64. Zwei der Kinder sind homozygote Träger einer sogenannten „splicing site“-Mutation, durch welche eine Deletion des Exon 29 in der mRNA des GPIIb entsteht, die anderen Familienmitglieder sind für diese Mutation heterozygot. Dadurch fehlt im Protein die Transmembran-Region der GPIIb-Untereinheit ganz (homozygote Patienten) oder teilweise (heterozygote Patienten). Der Restbesatz auf den Plättchen der homozygot betroffenen liegt hier unter 5% in der durchflußzytometrischen Messung, was sich funktionell wie ein fehlender Rezeptor darstellt.

Klinisch-anamnestisch waren bei den homozygoten Patienten Epistaxis, Gingivablutungen und Hämatome auffällig sowie eine verlängerte Blutungszeit >30 min, gemessen mit einem standardisierten Schnittgerät bei 40 mm Hg angelegtem äußeren Manschettendruck. Die heterozygoten Patienten sind klinisch unauffällig, der verminderte Rezeptorbesatz von 50 % wurde jedoch durchflusszytometrisch nachgewiesen. Im Kontrast hierzu sind die Messwerte von Quick und PTT unserer Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann im Normalbereich und völlig unauffällig (Daten nicht aufgeführt).

Die TGT-Parameter der untersuchten Patienten mit GT sind als Boxplots in den Fig. 4.1. (a-d) dargestellt.

4.1. (a) Thrombasthenie-Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten; Thombinbildung (TGT); Endogenes Thrombinpotential (ETP)



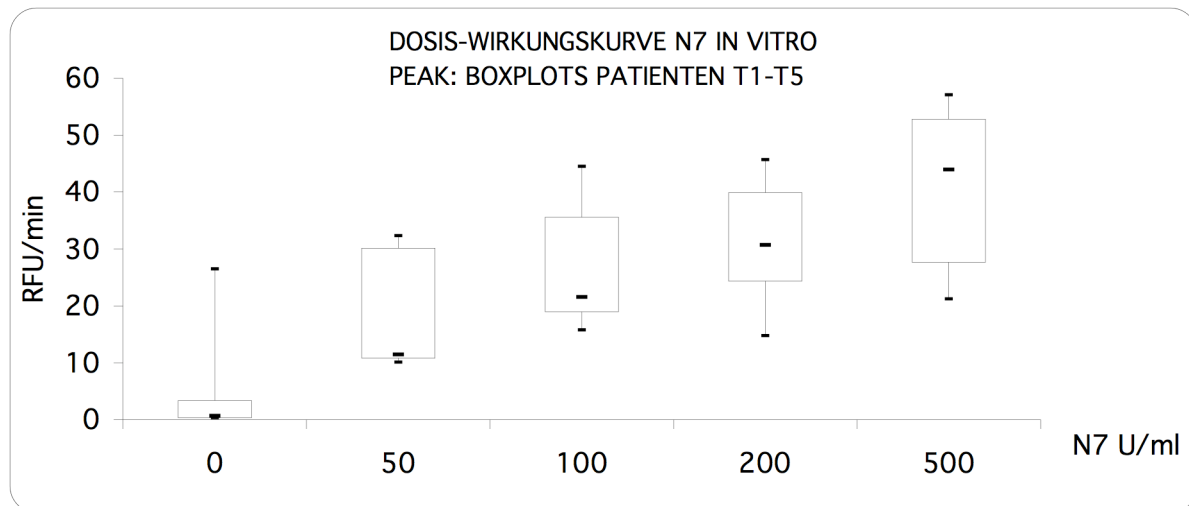
ETP	N7 U/ml	0	50	100	200	500
	Q1	3,76	124,08	425,52	708,90	881,69
	MIN	3,76	96,74	414,60	390,24	670,59
	MEDIAN	10,38	150,65	427,54	838,73	973,67
	MAX	460,80	641,29	912,39	910,30	1119,04
	Q3	402,79	520,52	724,15	844,61	1086,93

Fig. 4.1. (a): Die Kurve zeigt ein normaläquivalentes rFVIIa-dosisabhängiges Ansteigen der über den Messzeitraum von 66 min gemessenen Gesamtthrombinaktivität. Das Wertenniveau liegt für die Patienten im oberen Bereich der gesunden Probanden (Fig. 1a, b). Auch der Schwellenwert mit der ersten wirksamen Dosis ist so hoch wie bei den Normalpersonen.

Beim ETP sieht man wie bei den Normalpersonen für hohe N7-Konzentrationen >100 U/ml eine Schwankungsbreite von 100% oder mehr, im unteren Bereich (50 U) liegt

sie bei ca. 600 %. Mit steigenden N7-Konzentration gehen Spannbreiten für die Patienten mit 400% bei den nächsthöheren Dosen zur maximalen Konzentration hin auf 250% hin zurück. Das ETP unter N7 liegt durchweg höher als bei den gesunden Probanden.

4.1. (b) Thrombasthenie-Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten; TGT; PEAK

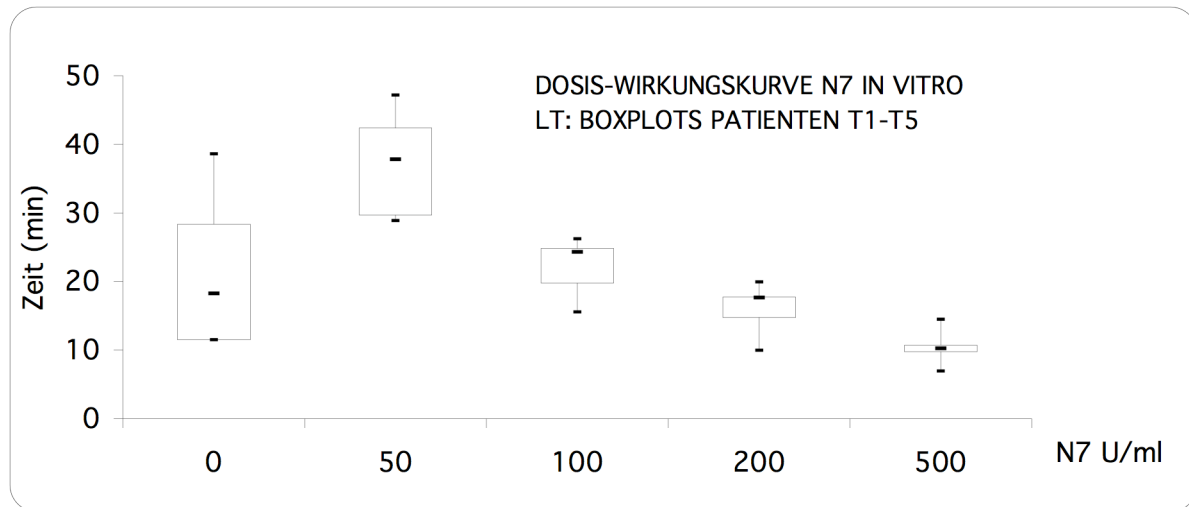


PEAK	N7 U/ml	0	50	100	200	500
	Q1	0,31	10,81	18,96	24,35	27,66
	MIN	0,31	10,13	15,77	14,76	21,21
	MEDIAN	0,69	11,45	21,54	30,70	43,93
	MAX	26,48	32,35	44,53	45,69	57,08
	Q3	3,39	30,16	35,60	39,92	52,83

Fig. 4.1. (b): Anstieg der maximalen Thrombinbildungsgeschwindigkeit mit der rFVIIa-Dosis. Erste Wirkung bei 50 U/ml. Minimalwert der Boxplots beschreibt das Wertenniveau für die homozygoten Patienten [siehe auch Fig. 4.1. (f)].

Die Zusammenfassung von hetero- und homozygoten Patienten in Boxplots wird zur Darstellung der Spannbreite der Werte von Thrombasthenie Glanzmann-Patienten gewählt, da bei der Diagnosestellung der Genotyp meist noch nicht bekannt ist.

4.1. (c) Thrombasthenie-Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten;
Thrombinbildung; Lag Time (LT)

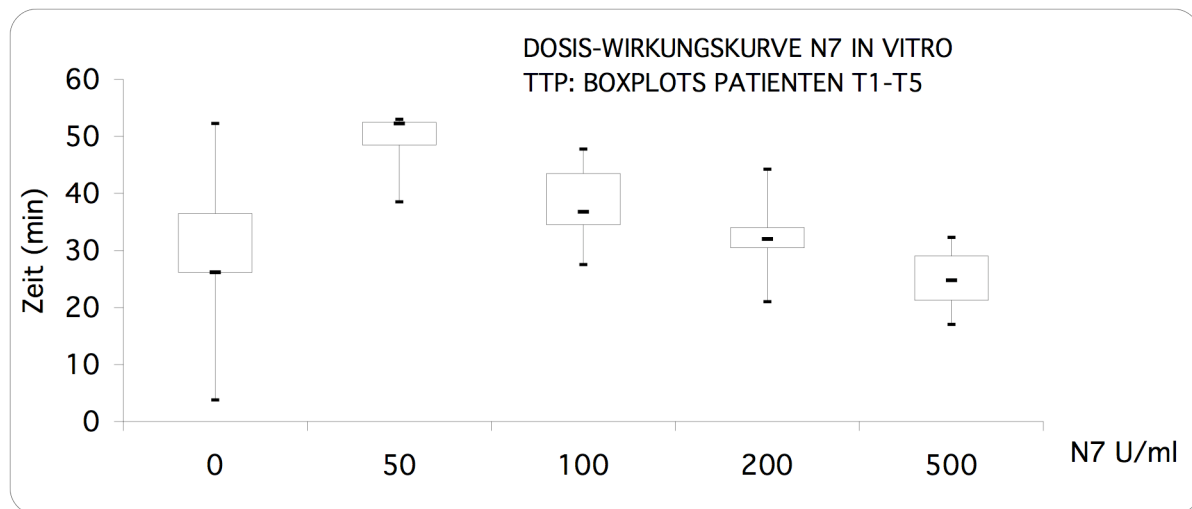


LAG TIME	N7 U/ml	0	50	100	200	500
	Q1	11,50	29,70	19,80	14,77	9,76
	MIN	11,50	28,89	15,54	9,95	6,93
	MEDIAN	18,23	37,81	24,29	17,62	10,22
	MAX	38,61	47,15	26,22	19,92	14,48
	Q3	28,37	42,35	24,80	17,72	10,69

Fig. 4.1. (c): Die LT für TG-Patienten nimmt quasihalblogarithmisch um einen fast konstanten Betrag mit steigender N7-Dosis ab. Das Wertniveau der zwei niedrigen Konzentrationen liegt unter dem, das der höheren im Bereich der Normalpersonen.

Die LT-Veränderung weicht mit ihrer linear bzw. halblogarithmisch fallenden Charakteristik von dem eher exponentiellen Abfall der gesunden Kontrollen (Fig. 1.3. b) ab.

4.1. (d) Thrombasthenie-Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten; Thrombinbildung; TIME TO PEAK



TIME TO PEAK	N7 U/ml	0	50	100	200	500
	Q1	26,17	48,50	34,50	30,50	21,25
	MIN	3,75	38,50	27,50	21,00	17,00
	MEDIAN	26,17	52,25	36,75	32,00	24,75
	MAX	52,25	53,00	47,75	44,25	32,25
	Q3	36,50	52,50	43,50	34,00	29,00

Fig. 4.1. (d): Das Diagramm zeigt die Abnahme der TTP mit steigender N7-Dosis. Die Schwankungsbreite liegt über der der LT in diesem Patientenkollektiv. Die Zeitparameter ohne N7 (Nullwerte) haben nur bei von Null verschiedenem ETP Aussagekraft.

Die Signalspannbreiten der Thrombinaktivitätsparameter LT und TTP sind kleiner als die der Zeitparameter ETP und PEAK. Gegenüber den gesunden Probanden sind die Medianzeiten der TTP durchweg verlängert bei einer Charakteristik, die ähnlich wie bei der LT der hier untersuchen fünf GT-Patienten erscheint und daher hier ebenfalls linearisiert erscheint.

4.1.1. Thrombinbildung bei Thrombasthenie Glanzmann-betroffener Familie, Einzelprofilardarstellung

Die TGT-Einzelprofile sind zur Unterscheidung der jeweiligen TGT-Charakteristiken in den homo- und den heterozygoten Patienten in Figg. 4.1.1. (a-d) nebeneinander-gestellt. Die Unterscheidung von homo- und heterozygoten Patienten ist am besten in den Einzelprofilen bei ETP und PEAK möglich, der Median ist zur erleichterten Unterscheidung ebenfalls im Diagramm dargestellt.

4.1.1. (a) Thrombasthenie Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten; TGT-Einzelprofile mit Mediankurve, Endogenes Thrombinpotential

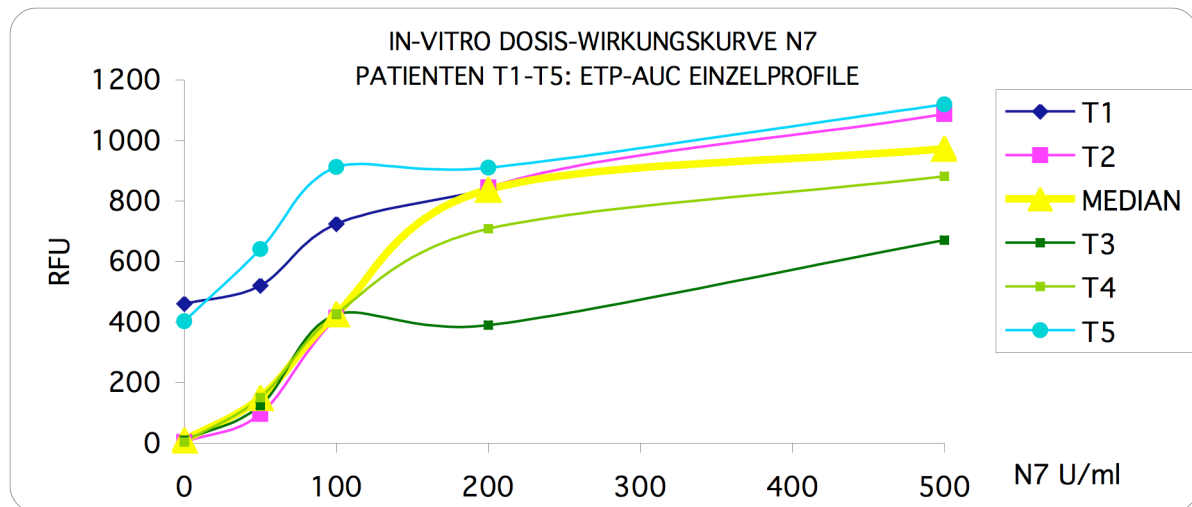


Fig. 4.1.1. (a): In der Einzeldarstellung der Patienten-ETPs gegen die N7-Konzentration liegen die homozygoten Patienten T3 und T4 unter dem Niveau der anderen, heterozygoten Patienten. Der Median aller fünf dient der besseren Unterscheidbarkeit der beiden genetischen Gruppen. Die Thrombozyten von T1 und T5 sind deutlich voraktiviert (0-Wert).

Das unter FVIIa generierte ETP liegt für alle Patienten außer T3 im Bereich des Niveaus der gesunden Probanden bzw. darüber bei vergleichbar sigmoider Charakteristik (Fig. 1.1. a). Homo- und heterozygote Patienten tendieren zu unterschiedlichen ETP-Niveaus.

4.1.1. (b) Thrombasthenie Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten;
TGT; Einzelprofile mit Mediankurve; PEAK

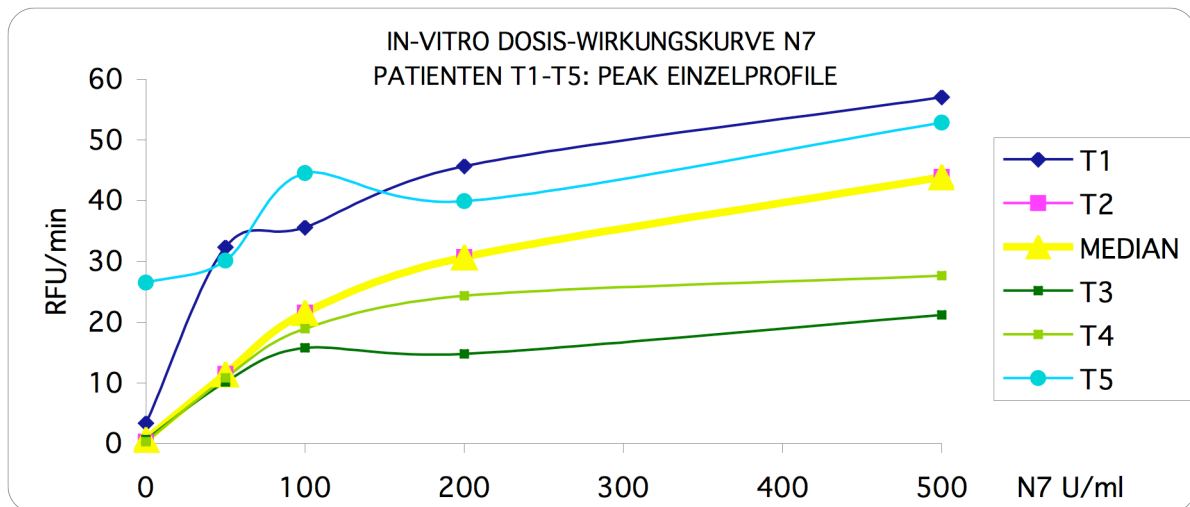


Fig. 4.1.1. (b): Bei den Patienten-PEAKs liegen die homozygoten Patienten T3 und T4 noch deutlich unter dem Niveau der anderen, heterozygoten Patienten als bei ihren ETPs. Nur Patient T5 ist voraktiviert. Der Median ist zur besseren Übersichtlichkeit in gelb mit dargestellt. T2 wird vom Median verdeckt.

Der PEAK der homozygoten Patienten reicht an der unteren Normalpersonenbereich heran, die heterozygoten weisen normale Werte (Fig.1.1. b) auf. Die Niveaus der beiden Gruppen divergieren klar, auch in der Charakteristik im höheren FVIIa-Konzentrationsbereich, in dem die heterozygoten noch leicht ansteigen, die homozygoten hingegen ihre maximale Thrombinrate nicht weiter steigern können.

4.1.1. (c) Thrombasthenie Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten; TGT Einzelprofile mit Median, Lag Time (LT)

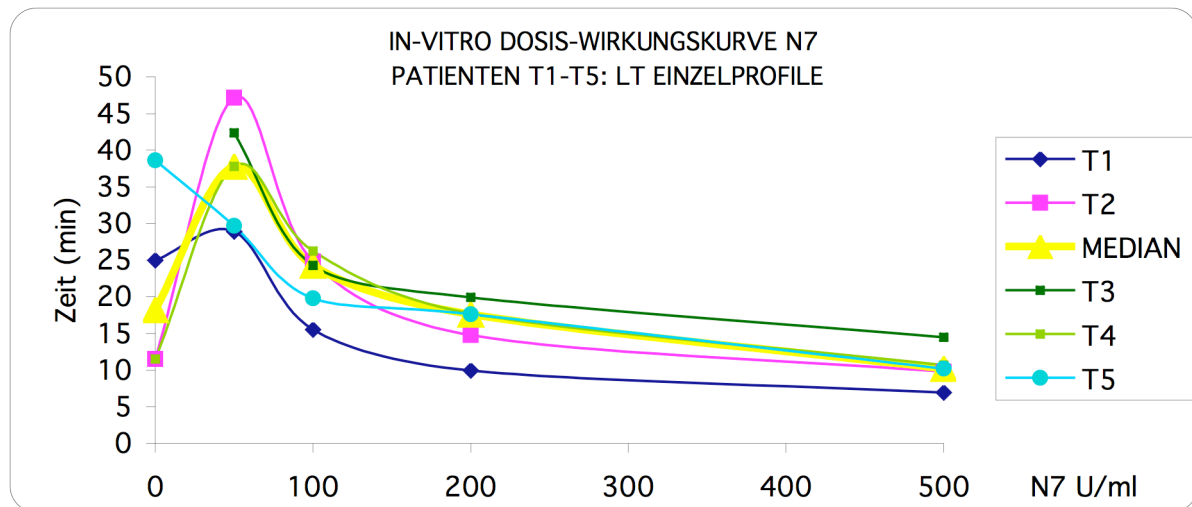


Fig. 4.1.1. (c): Bei der LT liegen die Profile der hetero- und die homozygoten Patienten deutlich enger beieinander um den eingezeichneten Gruppenmedian herum., d.h. die Variationsbreite ist geringer. Der erste Wert (0) ist wegen des niedrigen ETPs der Patienten nicht verwertbar, der Abfall der Kurve beginnt bei 50 U/ml. Ab 200 U/ml folgt der Sättigungsbereich.

Die Lag Time ist durch einen starken initialen (von 50 auf 100 U/ml rFVIIa) Abfall gekennzeichnet, danach folgt der Übergang in einen zweiten Bereich langsameren Rückgangs. Dieser zweistufige Phasenverlauf tritt bei den meisten gesunden Probanden ebenfalls auf (Fig. 1.1. c).

4.1.1. (d) Thrombasthenie Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten; TGT-Einzelprofile mit Median, TIME TO PEAK (TTP)

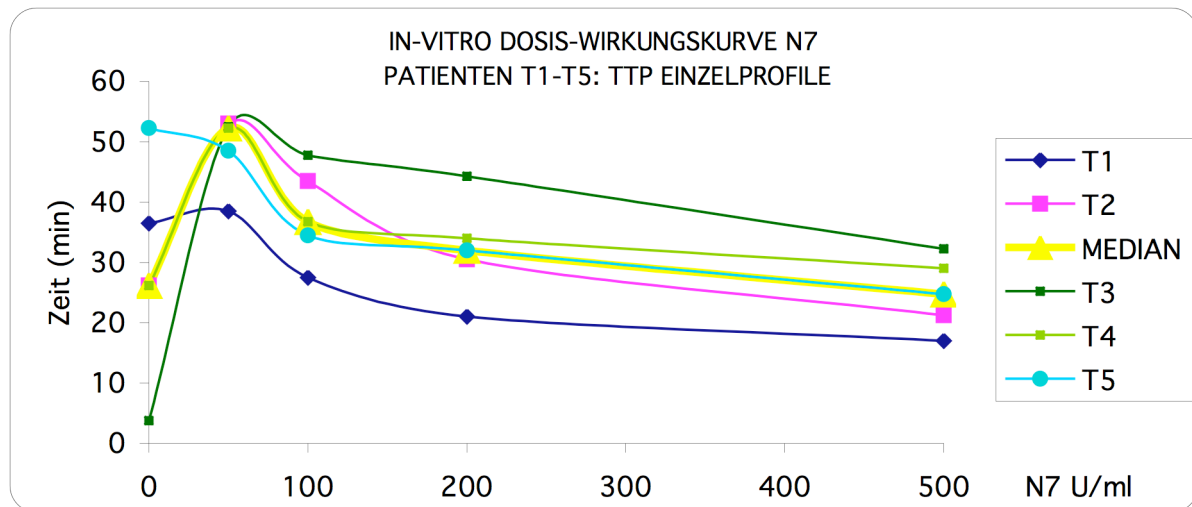


Fig. 4.1.1. (d): Bei der TTP liegen das Profil des homozygoten Patienten T3 mit längeren Zeiten außerhalb der Werte der anderen Patienten. T4 nimmt bei Konzentrationen ab 200 U/ml langsamer ab als T1, T2 und T5. Der erste Wert (0) ist wegen des niedrigen ETPs der Patienten T2, T3 und T4 nicht verwertbar. Der Abfall der Kurve beginnt bei 50 U/ml.

Bei den TGT-Zeitparametern LT und TTP liegen die Kurven enger zusammen als bei den Thrombinaktivitätsparametern ETP und PEAK. Die Voraktivierung bei T1 und T5 fiel teilweise geringer und heterogen gegenüber dem ETP aus. Die Variation zwischen den Patienten ist größer als die der Lag Time.

4.1.2. Thrombasthenie Glanzmann-betroffene Familie mit 5 Patienten, Durchflusszytometrie (FACS) vor und nach Gabe von rFVIIa

Zur Validierung der TGT-Parameter werden diese mit FACS im PRP als etablierter Diagnosemethode verglichen. Dabei werden als Thrombozytenfunktionen die Membranlipidexposition (Phosphatidylserin PS/Phosphatidylethanolamin PE) unter FVIIa-Stimulation, die zelluläre Sekretion sowie die Fibrinogenbindung sowohl des nichtaktivierten wie auch des aktivierten GPIIb/IIIa unter ADP- bzw. TRAP-Konzentrationsreihen zur Messung herangezogen. Dabei kommen sowohl rFVIIa wie auch andere, bereits etablierte in Protokollen etablierte Agonisten wie ADP und TRAP (Thrombin-Rezeptor-Aktiverendes-Peptid, Sequenz: SFLLRNP) zum Einsatz.

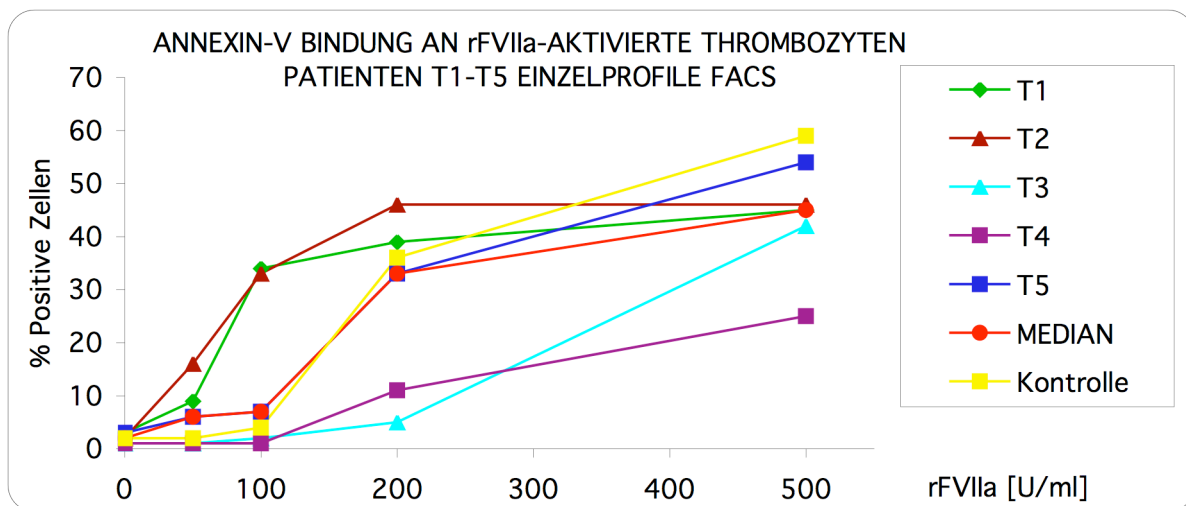


Fig. 4.1.2. (a): Annexin V bindet an exponiertes PS/PE, welches sich nach Stimulation der Thrombozyten auf der Membranaußenseite findet. Der Expositionsgrad ist für alle Patienten von der rFVIIa-Konzentration abhängig. Die homozygoten Patienten T3 (außer für die höchste Konzentration) und T4 fallen gegenüber den anderen ab 100 U/ml um mehr als 50 % ab.

Die Annexin V-Bindung ist ein Surrogatparameter für die Membranaktivierung der Plättchen unter Stimulation. Das Gesamtbild erinnert an das ETP der Thrombinbildung, nur dass hier Patient T4 statt Patient T3 abfällt. Die sigmoide Charakteristik der rFVIIa-Dosis-Wirkungskurve ist, außer bei T3, ebenfalls vorhanden. Die heterozygoten Patienten liegen im Verlauf bei der Normalkontrolle.

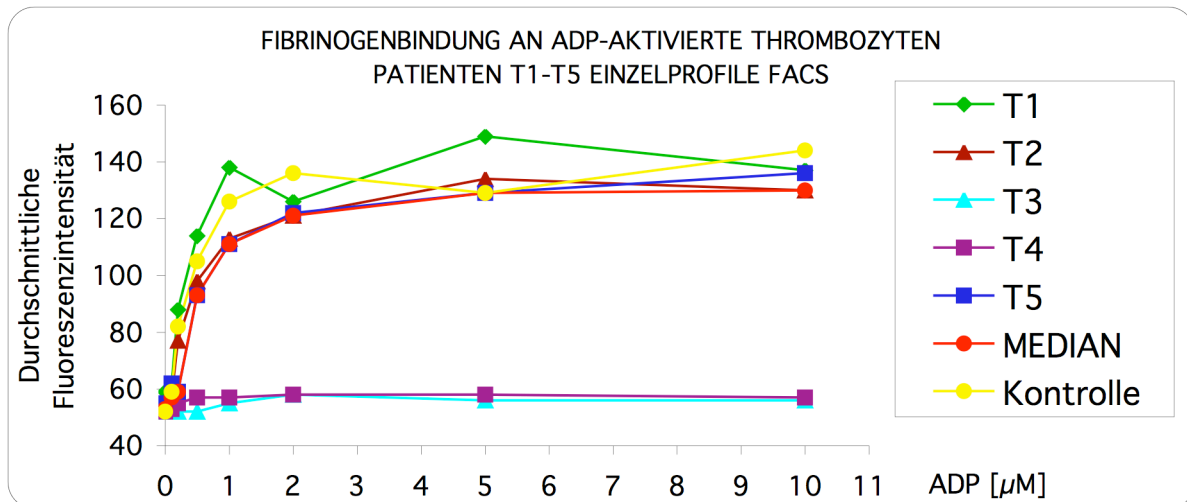


Fig. 4.1.2. (b): Die Untersuchung der GPIIb/IIIa-Bindungsfähigkeit an Fibrinogen unter ADP zeigt die homozygoten Patienten T3 und T4 als Non-Responder. Die heterozygoten Patienten und die gesunde Kontrolle stimmen überein, ihre Charakteristik ist logarithmisch (kein Latenzbereich, überproportionaler Anstieg im niedrigen ADP-Konzentrationsbereich, anschließend folgt eine Sättigungsphase).

Die Aktivierung der Fibrinogenbindungsfähigkeit auf den schwachen Agonisten ADP hin zeigt große relative Unterschiede in der thrombozytären Reaktionsfähigkeit zwischen gesunden Probanden und heterozygoten GT-Patienten einerseits und homozygoten GT-Patienten andererseits. Deren Plättchen verhalten sich diesbezüglich fast inert.

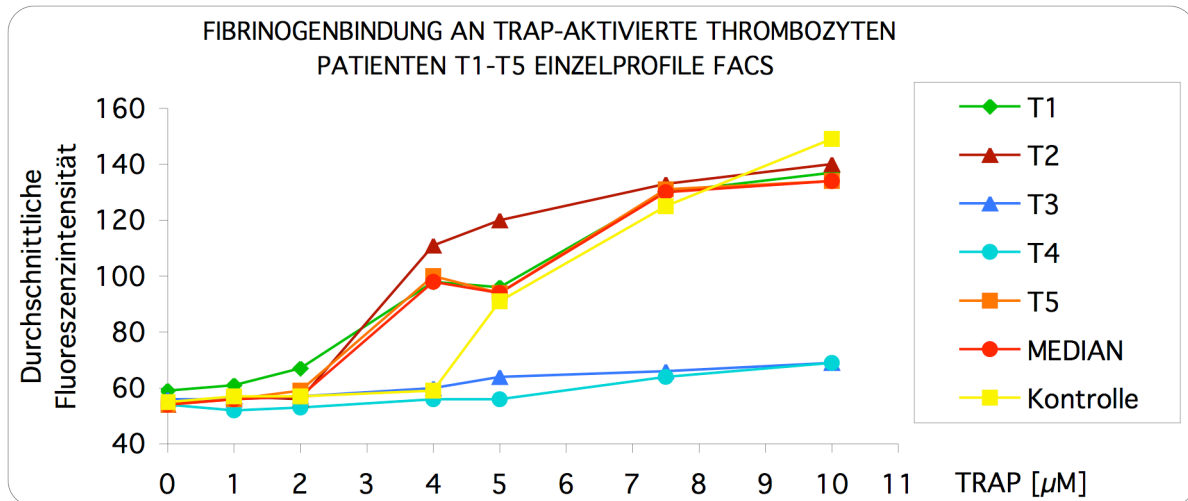


Fig. 4.1.2. (c): Die GPIIb/IIIa-Bindungsfähigkeit an Fibrinogen unter TRAP beginnt im Median ab einer Konzentration von 2 μM zu steigen. Ein Plateau bei höheren Konzentrationen beginnt ab 7,5 μM). Die thrombozytäre Fibrinogenbindung bei den Patienten T3 und T4 bleibt weitgehend reaktionslos auf Basisniveau (Steigerung $\leq 20\%$ gegenüber 160 % der anderen Patienten).

Die Aktivierung der Fibrinogenbindungsfähigkeit auf TRAP gegenüber ADP beginnt erst bei höheren Molaritäten. Die homozygoten GT-Patienten reagieren geringgradig, während die gesunden Probanden und heterozygoten GT-Patienten die gleiche Spanne zeigen wie bei ADP.

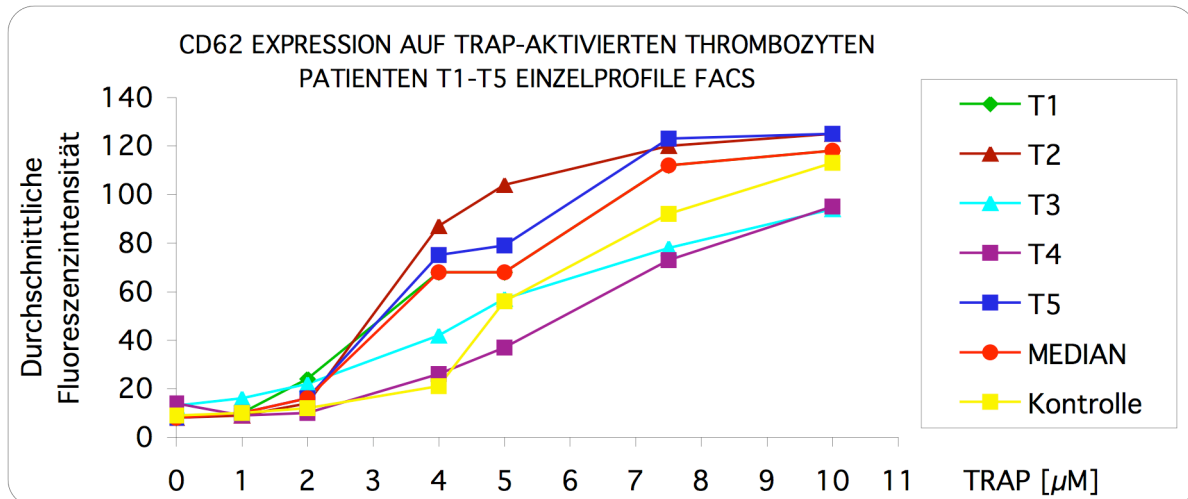


Fig. 4.1.2. (d): Es liegt bei allen GT-Patienten wie auch bei der Kontrolle eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Charakteristik der CD 62-Expression unter TRAP-Stimulation als aktivierungsabhängiger Sekretionsmarker vor. Diese weist eine Latenzphase bis 2 μ M, überproportionalem Anstieg bis 8 μ M und Sättigungsplateau bei höheren Konzentrationen auf. Die Gesamtspanne des Fluoreszenzsignals liegt hier bei 400 % des Basisniveaus.

Die homozygoten Patienten sind im insgesamt eher heterogenen Kollektiv schwerer von der Kontrolle bzw. den anderen, heterozygoten Patienten zu unterscheiden. Ihre sigmoide Dosis-Wirkungscharakteristik ist im Vergleich abgeflacht. Diese Untersuchung zeigt die geringsten Unterschiede zwischen homozygot und funktionell normal.

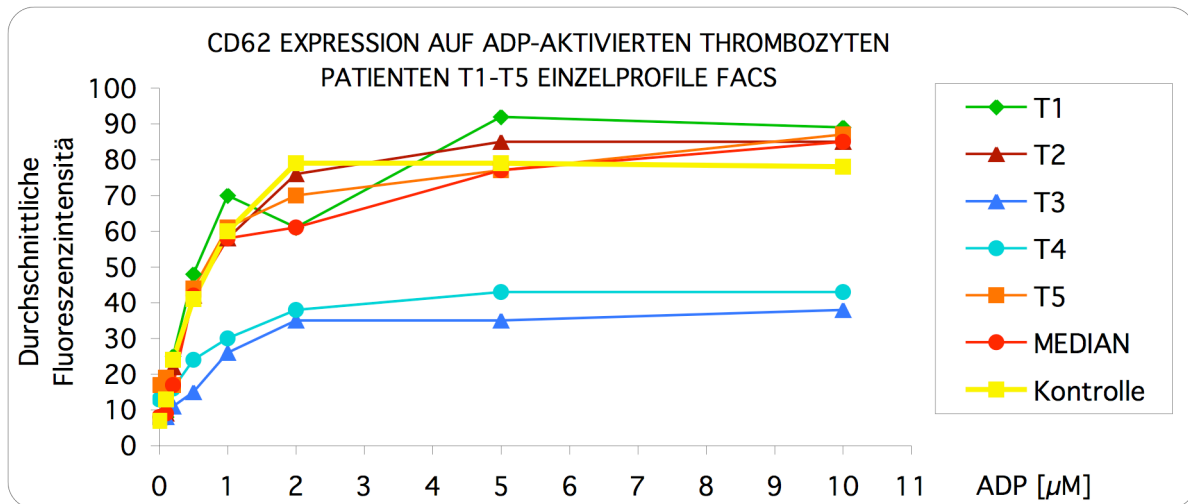


Fig. 4.1.2. (e): Die Untersuchung der CD 62 Expression als aktivierungsabhängiger Plättchen-Sekretionsmarker unter ADP zeigt die homozygoten Patienten T3 und T4 als moderat ansprechend (Basiswertsteigerung +300 %). Die heterozygoten Patienten und die gesunde Kontrolle sind im Ansprechverhalten im gleichen Bereich (Basiswertsteigerung +800 %) bei logarithmischer Charakteristik.

Trotz eines im Vergleich zu den anderen FACS-Messungen bei der GT-betroffenen Familie eher geringer Differenz sind die funktionell unauffälligen Patienten und die Normalkontrolle gut von den homozygoten Patienten zu unterscheiden. Die Sekretion erscheint damit insgesamt weniger betroffen als die Fibrinogenbindung und die Membranlipidexposition.

Im TGT sind die Auswirkungen der veränderten Plättchenphysiologie, die sich im FACS darstellen lässt, auf der Ebene der nicht ausschließlich zeitabhängigen Parameter für die homozygoten Patienten im Unterschied zu den heterozygoten Patienten (Fig. 4.1.1. a-d) und den Normalwerten (Fig. 1.1. a-d) messbar. Quick und PTT reagieren bei Thrombasthenie Glanzmann völlig unauffällig.

4.2. Patient EG - Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann (GT)

Bei Patient EG (41 Jahre, 65 kg) liegt eine Insertion in Exon 20 des GPIIb-Gens vor, die den GPIIb/IIIa-Rezeptordefekt bedingt. Der Rezeptorrestbesatz auf den Plättchen liegt unter 5%, was sich funktionell wie fehlender Besatz auswirkt. Klinisch-anamnestisch waren Epistaxis, Gingivablutungen und Hämatome auffällig, eine verlängerte Blutungszeit >30 min, gemessen mit einem standardisierten Schnittgerät bei 40 mm Hg angelegtem äußeren Manschettendruck.

Da FACS die Methode zur definitiven Bestimmung einer Thrombasthenie Glanzmann darstellt, wenn vorher nur eine Plättchenfunktionsstörung diagnostiziert wurde, und gleichzeitig eine darüberhinausgehende Charakterisierung der Thrombozytenfunktion durch die Detektion der Expression markierter Proteine nach Aktivierung ermöglicht, wird sie hier zum Vergleich mit der Thrombinbildung herangezogen, die ebenfalls aus physiologischen Gründen die Thrombozytenfunktion in die Messung mit einbezieht.

Die hier gemessenen und dargestellten durchflusszytometrischen (FACS-) Messansätze [Fig. 4.2.1. (a-g)] sowie die TGT-Parameter [Fig. 4.2.2. (a-d)] wurden zur Unterscheidung der Vorher- und der Nachher-Situation nach N7-Gabe im Rahmen einer Zahnextraktion miteinander verglichen. Die Dosis wurde mit einer Zielgröße von 110 µg/kg Körpergewicht und 65 kg Gewicht als 360 kIU errechnet. Das Dosierungsregime bestand aus einer präoperativen Bolusgabe, einer postoperativen Gabe 150 min später bei Bedarf. Die Dosis lag bei jeweils 360 kIU. Die erste nach Bolusgabe entnommene Probe wurde vor der Bolusgabe präoperativ gemessen, die zweite Probe 15 min nach Gabe und die dritte 120 min für den Nachweis einer anhaltenden Wirkung. Sie sind in den Diagrammen mit I,II, III bzw. 1./2./3. indexiert. Der geplante zweite Bolus nach 150 h wurde aufgrund der hämostatischen Wirkung des ersten Bolus nicht mehr appliziert.

4.2.1. (a-g): Patient EG, Durchflusszytometrie (FACS) vor und nach Gabe von rFVIIa

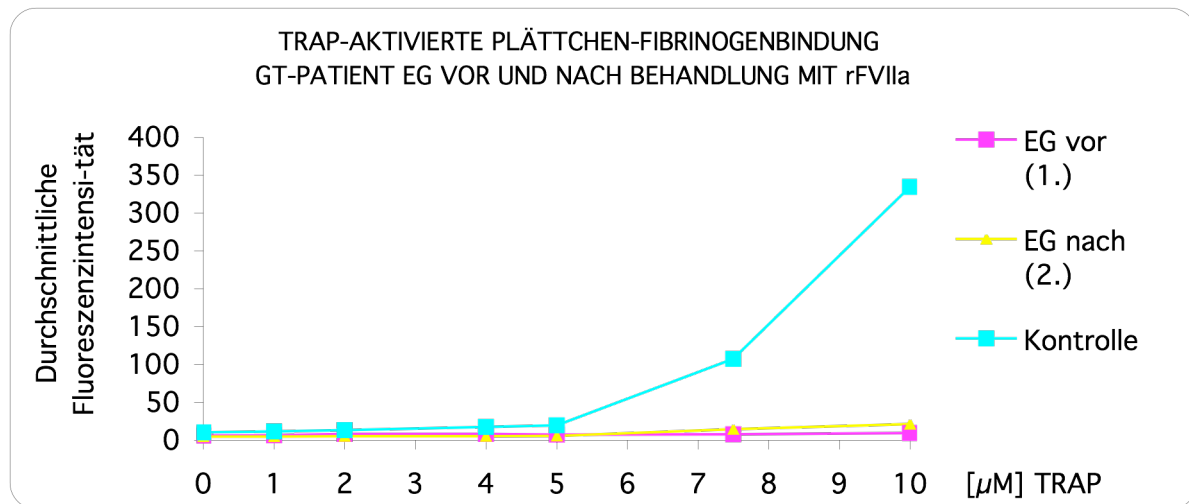


Fig. 4.2.1. (a): Die fehlende Fibrinogenbindung, hier als Fluoreszenzsignalstärke unter verschiedenen TRAP-Konzentrationen, ist ein typisches Messergebnis bei Vorliegen eines thrombozytären Fibrinogen-rezeptordefektes vom Typ Thrombasthenie Glanzmann (GT). Das Diagramm zeigt den deutlichen Unterschied zur gesunden Kontrolle.

Es zeigt sich bei der Fibrinogenbindung nach Aktivierung durch ADP als indirekt wirkender Aktivator über alle Konzentrationen hinweg eine sehr geringe Fibrinogenbindungsreaktion der Plättchen, was auch durch Gabe von rFVIIa nicht verändert wird.

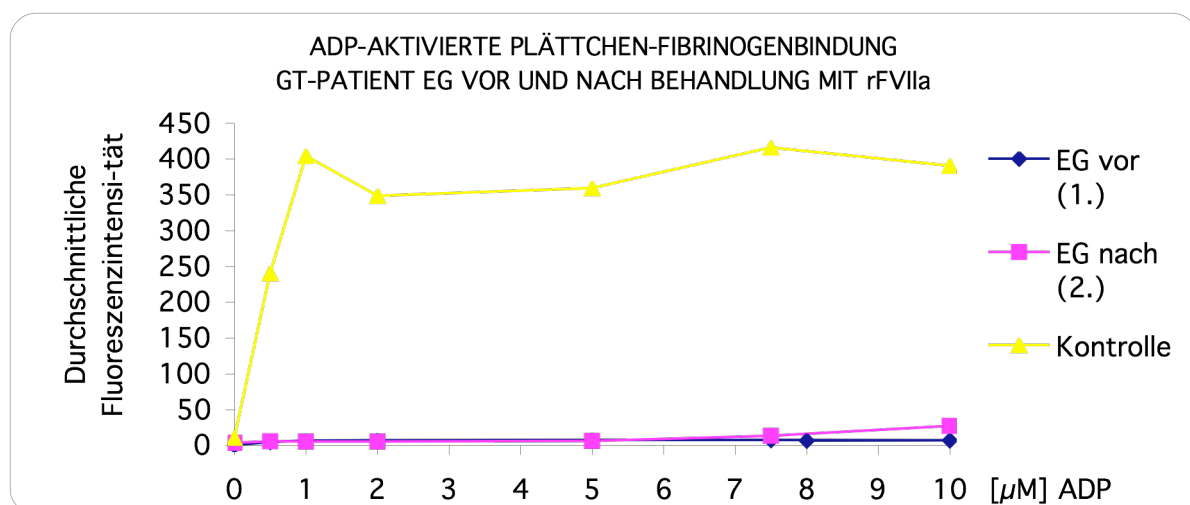


Fig. 4.2.1. (b): Die Stimulation mit ADP zeigt ein zur Stimulation unter TRAP (Fig. 4.2.1. a), einem agonistischen Peptid am thrombozytären Thrombinrezeptor vom Typ PAR-1 (hochaffin), ein übereinstimmendes Bild. Auch hier ist bei der GT-Patientin kein Effekt unter rFVIIa zu sehen.

Die schnell eintretende, über den hochaffinen Thrombinrezeptor (PAR-1) vermittelte Aktivierung der thrombozytären Fibrinogenbindung durch TRAP lässt sich bei Patient EG nicht auslösen. Auch hier tritt, wie bei ADP, unter FVIIa-Gabe keine Änderung, beispielsweise im agonistischen Sinn ein.

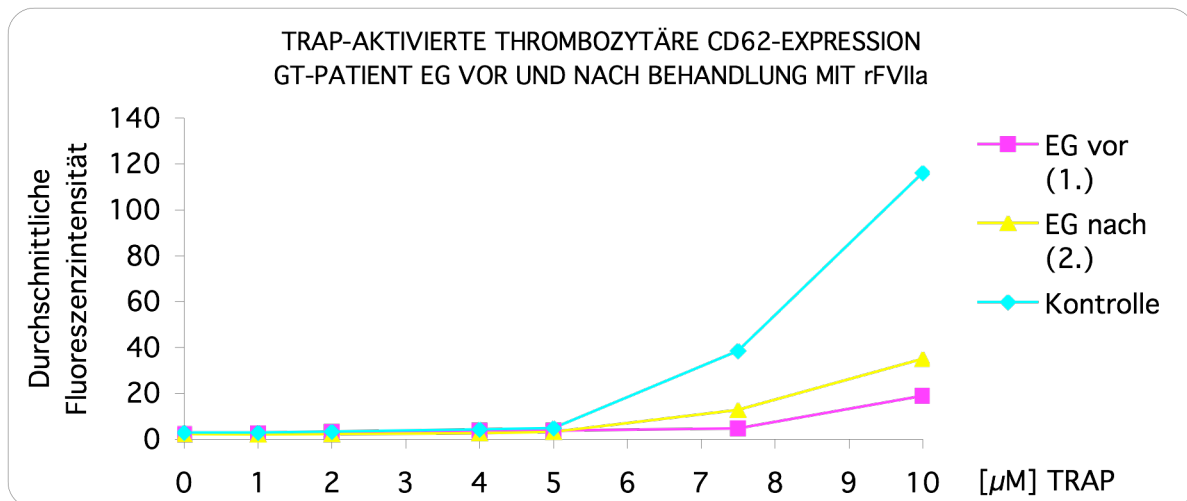


Fig. 4.2.1. (c): Bei CD 62 als Sekretionsmarker ist die Expression unter TRAP nur in der Schwelle verschoben, die Reaktion erfolgt also bei höheren Konzentrationen als bei der Kontrolle. Bei ADP erfolgt keine CD62-Expression.

CD62 als Markierungssubstanz der sezernierenden Plättchenaktivierung spricht auf hohe TRAP-Konzentrationen an, aber im Vergleich zur Normal-Kontrolle ab einer späteren Schwelle und schwächer. Das Niveau der Expression ist unter FVIIa gesteigert, bleibt aber gegenüber der Kontrolle reduziert.

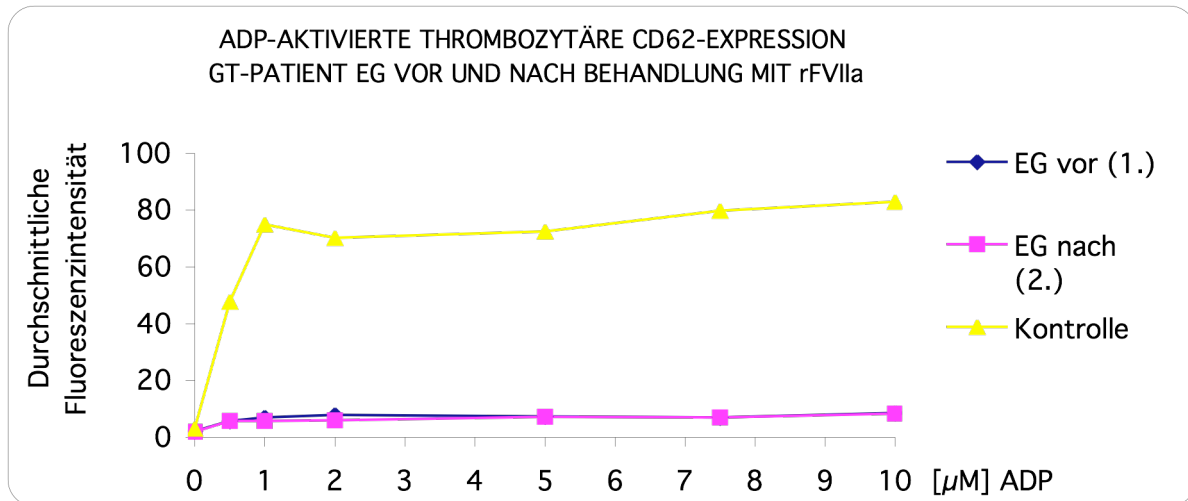


Fig. 4.2.1. (d): Auch die Plättchen-Sekretion des Patienten, gemessen als CD62, spricht übereinstimmend zur Fibrinogenbindung nicht auf ADP als Stimulus an. Zum Vergleich die ebenfalls analoge Reaktion der intakten Thrombozyten (Kontrolle).

Unter ADP lässt sich die thrombozytäre Sekretion der Thrombozyten dieses Patienten nicht mehr als marginal steigern. Diese Reaktionsträgheit ist unter rFVIIa unverändert.

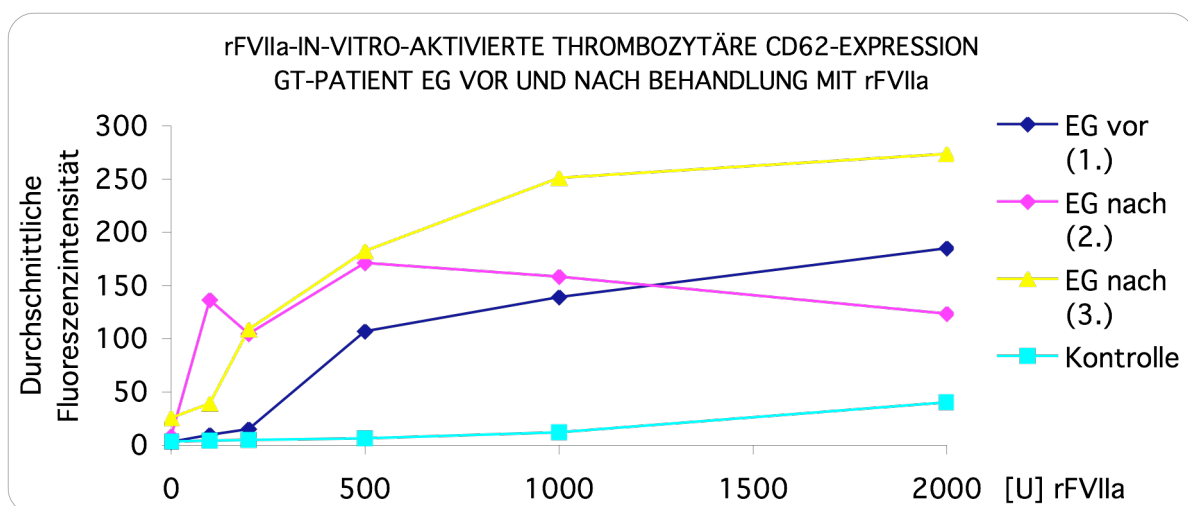


Fig. 4.2.1. (e): In-vitro Aktivierung mit rFVIIa. Die thrombozytäre Sekretion lässt sich schon bei niedrigen therapeutischen Konzentrationen stark steigern. Der Effekt der Bolusgabe stellt sich erst nach 15 min ein. Das Ansprechen der Kontrolle ist aufgrund eines Präparationsfehlers nicht aussagekräftig.

Bei in-vitro Aufsubstitution im therapeutischen Bereich wird die CD 62 Expression

durch rFVIIa alleine nicht geändert. Erst supraphysiologische Konzentrationen sorgen für eine Expressionssteigerung, deren Stärke und Schwelle nach der in vivo-Gabe zunimmt bzw. gesenkt wird. Dieser Effekt hält auch nach 2 h abgeschwächt an.

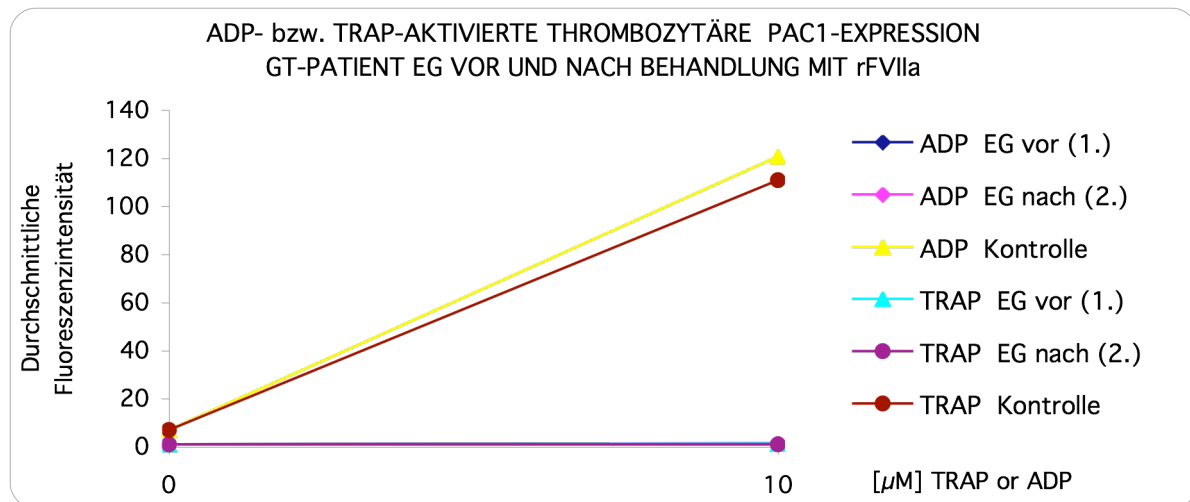


Fig. 4.2.1. (f): Keine Reaktion in der PAC-1-gebundenen Expression, die den nur den aktivierten GPIIb/IIIa Rezeptor erkennt, auf ADP oder TRAP beim GT-Patienten, kontrastierend mit der Normalreaktion.

Fibrinogen-Bindung und PAC1-Expression zeigen die fehlende Reaktionsfähigkeit sowohl des aktivierten wie auch des nichtaktivierten Fibrinogenrezeptors auf ADP wie auch auf TRAP.

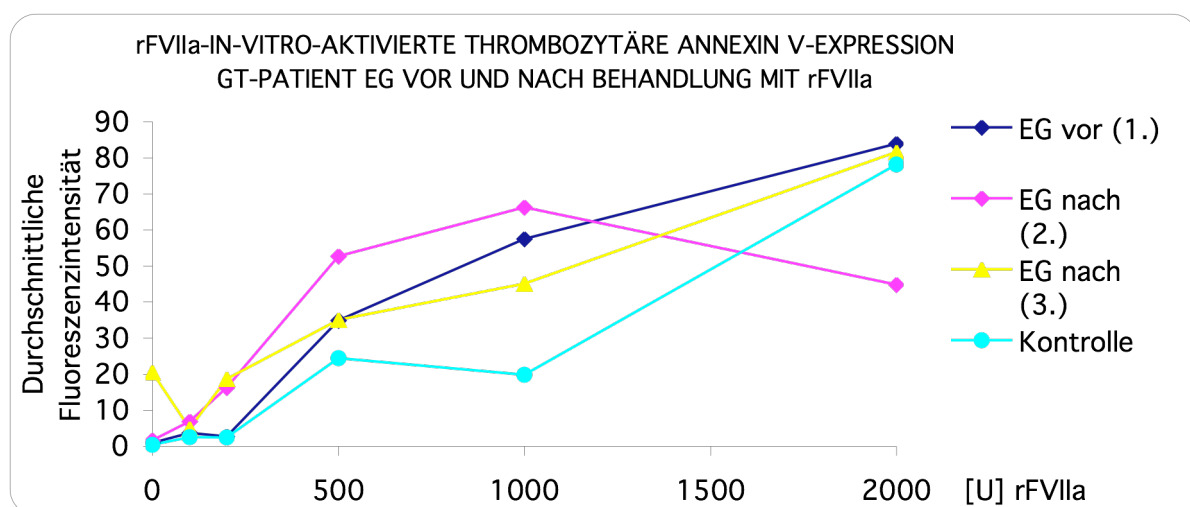


Fig. 4.2.1. (g): Die Annexin-V-Expression unter rFVIIa als einzigem Stimulus ist bei der

gesunden Kontrolle und dem Patienten weitgehend übereinstimmend. Kein Unterschied vor und nach Gabe von N7 als Bolus.

Bei der Annexin-V-Messung unter rFVIIa-Stimulation wurde ein analoges Verhalten der Patientenplättchen zur Normalkontrolle beobachtet. Dies weist auf eine normale Fähigkeit zur Membranlipid-Exposition unter Aktivierung hin. Der Effekt wird durch die Bolusgabe von rFVIIa gesteigert (Wert 2.) und hält auch 2 h nach Gabe (Wert 3.) an.

Die schwache Sekretionsstimulation unter ADP und TRAP (Figg. 4.2.1. c und d) steht im Gegensatz zur quasinormalen unter rFVIIa (Fig. 4.2.1. e). Sowohl der gesamte (via Fibrinogenbindung, Fig. 4.2.1. a und b) wie auch der aktivierte Fibrinogenrezeptor (PAC1, Fig. 4.2.1. f) zeigen keine aktivierbare Funktion unter TRAP oder ADP.

4.2.2. Patient EG, Thrombingenerierung vor und nach rFVIIa-Bolusgabe

Die folgenden TGT-Parameter dienen dem Vergleich der Parameter der Thrombingenerierungsfähigkeit in PRP nach Gabe von und unter in-vitro Aufsubstitution mit rFVIIa. Dafür werden Dosis-Wirkungskurven vor und nach Gabe aufgenommen.

4.2.2. (a): Patient EG, Thrombingenerierung, Endogenes Thrombinpotential (ETP)

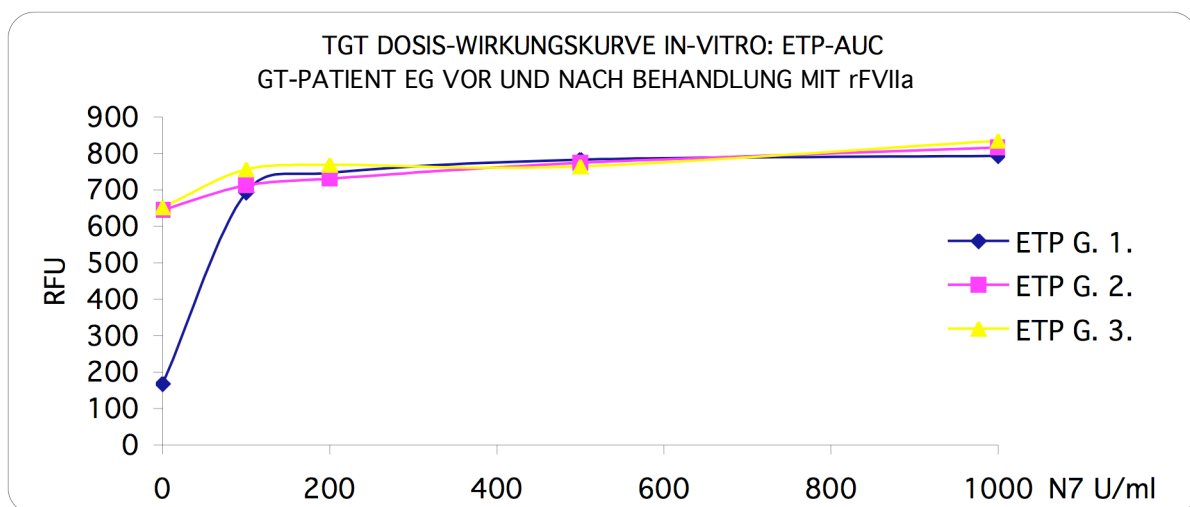


Fig. 4.2.2. (a): Die Anhebung des Thrombinbildungspotentials (ETP) durch rFVIIa-Bolusgabe zeigt sich durch den erhöhten Leerwert und die praktisch aufgehobene Dosis-

Wirkungskurve, die nur noch den Sättigungsbereich zeigt. Die Wirkung hält auch beim 2h-Entnahmeternin noch an. Die Punkte (G. 1., G. 2. und G. 3.) geben die Blutprobenentnahmepunkte vor Bolus (G. 1.), 15 min danach (G. 2.) und 2 h danach (G. 3.) an.

Vor Gabe (G. 1.) ist ein durch die thrombozytäre Voraktivierung bestimmtes Basisniveau ohne FVIIa erkennbar, das bei 100 U/ml schon das Sättigungsplateau erreicht. Diese Steigerbarkeit ist 15 min nach der Bolusgabe nur noch stark abgeschwächt darstellbar (G. 2.), der Effekt hält auch nach 2 h an (G. 3.).

4.2.2. (b): Patient EG, Thrombingenerierung, maximale Thrombinbildungsrate (PEAK)

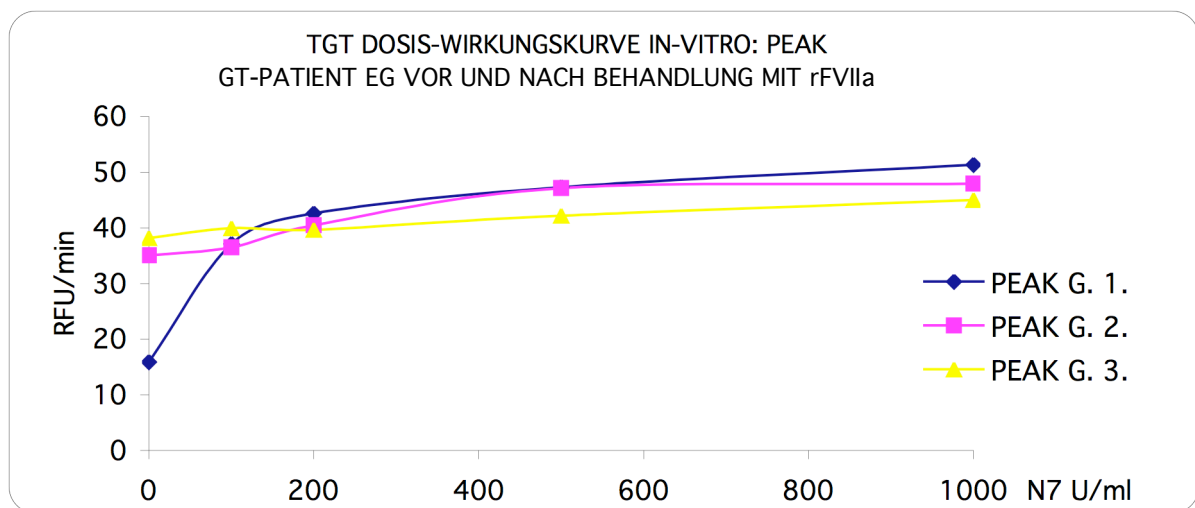


Fig. 4.2.2. (b): Die maximale Thrombinbildungsgeschwindigkeit (PEAK) zeigt sich durch den erhöhten Leerwert nach rFVIIa-Bolusgabe. Auch hier ist, analog zum ETP, von der Dosis-Wirkungskurve nur noch das Plateau vorhanden. Die Wirkung hält auch beim 2 h-Entnahmeternin (G. 3) noch an.

Die maximale Thrombinbildungsrate (PEAK) verhält sich hier analog zum ETP. Die entnahmebedingte Voraktivierung der Plättchen wird durch den rFVIIa-Bolus gesteigert und hebt den jeweiligen TGT-Parameter in den Sättigungsbereich.

4.2.2. (c): Patient EG, Thrombingenerierung, Lag Time (LT)

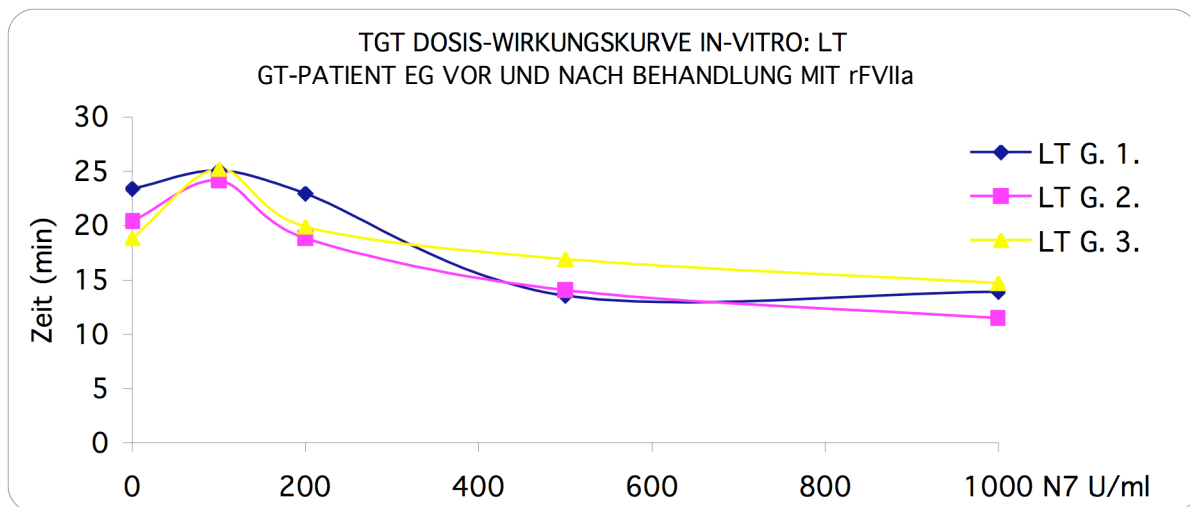


Fig. 4.2.2. (c): Die LT ist vor und nach Gabe bei Patient G. abfallend, wenn rFVIIa weiter aufsubstituiert wird. Vor Bolusgabe ist der Abfall eher gleichmäßig, bis bei 500 U/ml ein Basisniveau erreicht wird. Wird auf den nach Gabe im Blut vorhandenen N7 in-vitro aufsubstituiert, ist der Abfall von 100 bis 200 U/ml deutlich schneller als bei den folgenden höheren Konzentrationen.

Die Latenzzeit der Thrombingenerierung reagiert auf die Bolusgabe mit einer zusätzlichen Verkürzung im unteren Bereich der in-vitro-Konzentrationsreihe.

4.2.2. (d): Patient EG, Thrombingenerierung, TIME TO PEAK (TTP)

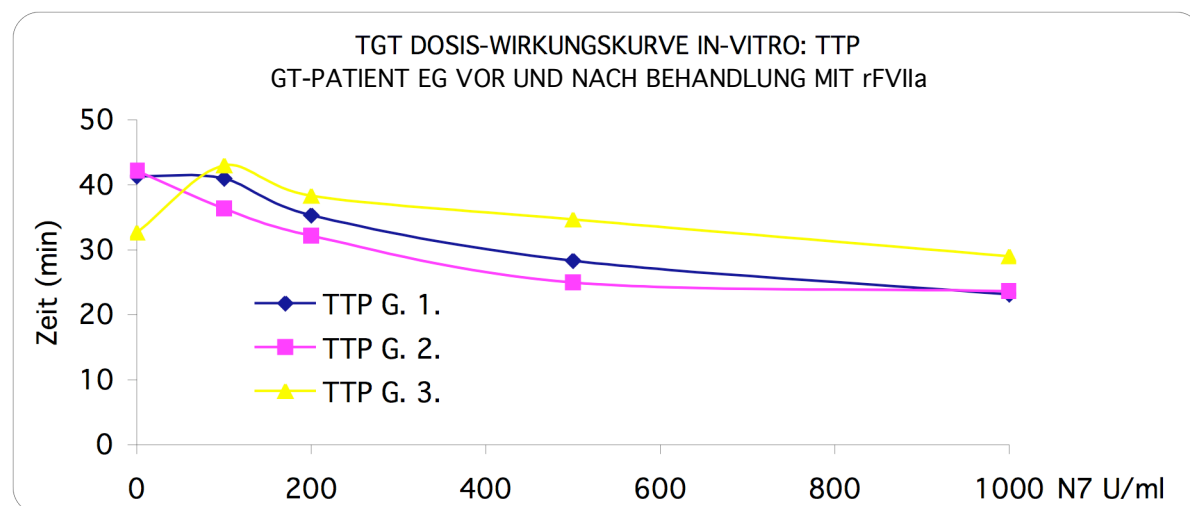


Fig. 4.2.2. (d): Die TTP-Charakteristik ist von einem gleichmäßigen Abfall gekennzeichnet. Auch hier ist ab 500 U/ml ein Sättigungsphänomen zu sehen. Die bei niedrigen Konzentrationen stärkere Reduktion der TTP tritt mit zeitlicher Verzögerung auf (bei G. 3., aber nicht G. 2.).

Die TTP der Thrombingenerierung reagiert auf die Bolusgabe bezüglich einer Verkürzung erst mit einer Gesamt-Verkürzung, nach 2 h aber mit Gesamt-Verlängerung und daher heterogen. Die Reaktion auf rFVIIa ist geringer als bei der LT.

Die rFVIIa-Wirkung bei Patient EG zeigt sich wie bei den anderen Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann am besten bei PEAK und ETP, wie auch in der FACS-Messung der Annexin-V und CD-62-Expression, als zunehmend mit steigender Dosis. Für diese FACS- wie auch die TGT-Parameter ist die Umorientierung der Membranlipide (Flip-Flop-Mechanismus) Voraussetzung, was besonders für die rFVIIa-Wirkung ohne TF relevant ist. Die ausschließlich zeitabhängigen TGT-Parameter LT und TTP zeigen über einen großen Bereich eine Dosisabhängigkeit.

Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte ein Gerinnungstest zu Überwachung der Therapie mit rFVIIa entwickelt und klinisch validiert werden. Die Entwicklung des Gerinnungstests für die therapeutische Wirksamkeits-Überwachung (Monitoring) von rFVIIa fand in plättchenreichem Plasma (PRP) statt, da die rFVIIa-Wirkung thrombozytenabhängig ist [101, 102]. Grundlage der Testentwicklung war die Thrombinbildungsmessung nach Hemker, die in dieser Arbeit modifiziert und für die Zielsetzung Therapie- und Wirksamkeitsüberwachung optimiert wurde [103]. Der hier entwickelte Thrombingenerierungstest (TGT) erfasst die gesamte Thrombinaktivität als Surrogatparameter der Gerinnung. Da bereits vorliegende Untersuchungen den Einfluß der sogenannten Kontaktaktivierung beschreiben [104], wurde deren Anteil mit Hilfe eines geeigneten Inhibitors bestimmt [105], wie auch der Einfluss des residualen Tissue Factors als physiologischer Reaktionspartner von FVIIa [106, 107].

Bisher wurden die meisten Untersuchungen, die sich mit der Wirksamkeit von FVIIa befassen, in thrombozyten- oder zellfreiem Plasma durchgeführt [121], Thrombozytenexperimente aber üblicherweise in Plasma ohne den Ersatz der Calciumionen (im Citratplasma) in heparinisiertem oder sogar im künstlichen Modell-Plasma [116, 123]. Diese Ansätze sind nicht geeignet, die Beobachtung der Wechselwirkungen zwischen zellulären und humoralen Komponenten des Gerinnungssystems zu ermöglichen [111], wie sie für die Wirksamkeitsüberwachung der Therapie mit FVIIa benötigt werden. Dies erklärt die geringe Korrelation zwischen Gerinnungsparametern in zellfreiem Plasma und FVIIa-Dosierung [150]. So konnte zum Beispiel die Relevanz von Thrombozyten für die hämostatische Wirksamkeit von rFVIIa bereits für Thrombozytopeniepatienten demonstriert werden [108, 109]. Darüber hinaus konnten diese Beobachtungen in in-vitro Modellen bestätigt werden [110], in denen rFVIIa die initiale Thrombinbildung steigerte, aber nicht auf Normalniveau bringen konnte. Für Thrombozytenzahlen zwischen 13 000 und 200 000 nahm die maximale Thrombingenerierung linear mit den Plättchenzahlen ab. [111]. Zusätzlich zur Abhängigkeit vom Thrombozytengehalt spielen individuelle Variationen der hämostatischen Funktionen von Plättchen eine entscheidende Rolle bei Gerinnungsvorgängen [111, 112, 113, 114]. In einem Plasma-Modellsystem mit vordefinierten Konzentrationen der Gerinnungsfaktoren

variierte die interindividuelle Schwankung der Prothrombinaseaktivität der isolierten und dann zugegebenen Thrombozyten um bis zu 300 % [115, 116]. Mit der Messung der TGT Parameter in PRP können sowohl die Wechselwirkung zwischen Plasma und Plättchen als auch die interindividuell unterschiedliche Gerinnungsaktivität erfasst werden [101 103, 118, 122], Somit bietet der Test die zurzeit physiologischste Art der Gerinnungsmessung.

Der bereits beschriebene Einfluss von TF auf die Wirkung von rFVIIa, besonders im Bereich niedriger TF- und FVIIa-Konzentrationen, macht die Untersuchung des Einflusses von im Blut vorhandenen, normalerweise äußerst geringen TF-Konzentrationen [106, 107] notwendig. Zudem kann, im Rahmen der Blutentnahmeprozedur durch Venenpunktion, ebenfalls TF-haltiges Zellmaterial direkt ins Blutentnahmeröhrchen gelangen und die Sensitivität, besonders im unteren TF-Spiegelbereich, herabsetzen [120]. Die Vorinkubation von PRP mit einem neutralisierenden TF-Antikörper konnte in unseren Versuchen das ETP für eine festgelegte rFVIIa-Konzentration erniedrigen, die Schwellendosis zur Steigerung des ETP erhöhen und den Anstieg der Dosis-Wirkungskurve bis zum Sättigungsbereich abflachen. Wir ermittelten eine höhere erforderliche rFVIIa-Konzentration, um das ETP-Wirkplateau unter Inkubation mit TF-Antikörper (TF-Ab) zu erreichen (500-1000 U rFVIIa/ml) als ohne (200 U/ml). Die ETP-Reduktion, wenn Werte für dieselbe rFVIIa-Konzentration mit und ohne TF-Ab verglichen werden, ging mit steigenden rFVIIa-Konzentrationen von 33 auf 6 % zurück. Der Schwerpunkt des Antikörpereinflusses lag daher wie erwartet im unteren Bereich der rFVIIa-Konzentrationen, der prokoagulatorische Einfluss von im Blut vorhandenen TF wird für alle TGT-Parameter besonders im unteren rFVIIa-Dosisbereich sichtbar und ist relativ gesehen stärker als im höheren Bereich. Dies stimmt überein mit dem Modell einer mit steigenden rFVIIa-Konzentrationen abnehmenden Bedeutung des in Plasma vorhandenen TF, sowie dem dominierenden Einfluss von verfügbaren Phospholipiden bei höheren FVIIa-Konzentrationen [145, 146]. Dass unter TF-Ab die maximale Thrombinbildungsrate (PEAK) mit steigenden FVIIa-Konzentrationen relativ stärker zunimmt als die im Messzeitraum erzielte summierte Thrombinaktivität (ETP) [146] und der Rückgang der LT sowie der TTP geringer ausfällt, unterstützt das phospholipidpräsentations-abhängige Modell [118, 148]: Die Wirkung eines

hinzugegebenen Antikörpers in der Initiationsphase der Gerinnungskaskade würde demnach für eine verzögerte Bereitstellung von Phospholipiden sorgen. Dieses hätte in Anwesenheit der geringen im Blut vorkommenden Konzentrationen von TF [106, 107], welcher ein hauptsächlicher Initiationsphaseneffektor ist, mehr Wirkung auf den als Gerinnungsauslöser eingesetzten rFVIIa. Dieser die rFVIIa-Wirkung verstärkende TF-Effekt ist für die praktische Anwendung von rFVIIa bei Krankheitsbildern, die mit stark erhöhten TF-Plasmaspiegeln einhergehen, von mindestens potentieller Bedeutung, so z. B. bei Tumoren [139, 149], Sepsis [137, 140], Trauma [137, 140], Aneurysmen [143], oder bei denen entzündlich oder gewebstraumatisch bedingt größere TF-Mengen in die Zirkulation gelangen können. Plasmaspiegelerhöhungen von TF, wie sie im Rahmen von Traumen und Entzündungen vorkommen, können dementsprechend die Wirksamkeit von FVIIa beeinflussen, je nach Verbrauch der anderen Gerinnungsfaktoren und der Thrombozyten fördernd oder hemmend, wie auch bei der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) [138, 41].

Neben einer Störung des Tests durch TF könnte eine im Labor beobachtete Kontaktaktivierung der Gerinnung die Messergebnisse verfälschen [152]. Um die Relevanz der Kontaktaktivierung für die Thrombinbildung zu untersuchen, wurden Vorversuche mit einem Hemmer der Kontaktaktivierung (CTI) durchgeführt. Die Versuche mit CTI als Inhibitor von FXIIa (siehe Ergebnisse, Unterpunkt 3.) und damit der Initiierung der Kontaktaktivierung bzw. des sogenannten intrinsischen Weges, weisen auf den vernachlässigbaren Einfluß dieses Signalwegs auf die rFVIIa-abhängige Thrombinbildung hin. Für andere Gerinnungsauslöser bzw. niedrigere Dosierungen ist ein stärkerer Einfluss der Kontaktaktivierung mindestens denkbar [104], was mit unseren gegensätzlichen Ergebnissen vereinbar ist.

Mit dem in Vorversuchen optimierten Test wurden zunächst gesunde Probanden untersucht. Damit sollten Dosis-Wirkungskurven von rFVIIa erstellt werden, um zu zeigen, wie sich ein normales Gerinnungssystem die Wirkung von rFVIIa darin und in unserem Messsystem darstellt [125]. Unsere Ergebnisse zeigen in Übereinstimmung mit in vivo [153] und in-vitro-Daten [117], dass rFVIIa die Thrombinbildung aus Prothrombin über den Tissue-Factor-abhängigen Reaktionsweg fördert. Unsere

Messungen zeigten auch, dass rFVIIa auch unabhängig von TF dazu in der Lage ist, wenn auch exklusiv auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten [118]. Dieses Ergebnis, konnte in den plasmatischen Gerinnungstesten nicht beobachtet werden, weil diese ohne die für diesen Effekt essentiellen Thrombozyten durchgeführt wurden. In Übereinstimmung mit kürzlich veröffentlichten experimentellen Daten anderer Gruppen [154, 155] zeigen unsere Ergebnisse, dass rFVIIa über eine Kombination von Tissue Factor (TF)-abhängigen und -unabhängigen Reaktionswegen wirkt. Wenn rFVIIa Zugang zu aktiviertem TF findet, wird Thrombin wahrscheinlich eher unter Mediation durch TF gebildet, wenn man die größere Affinität von TF zu rFVIIa im Vergleich zur Oberfläche aktivierter Plättchen betrachtet (K_d ca. 0,5 nM gegen. K_d ca. 90 nM). Wenn hingegen aktivierter TF nicht vorhanden ist, weil ein Plättchenpfropf das TF-tragende Subendothel verdeckt, oder TF von TFPI neutralisiert wird, kann Thrombingenerierung im größeren Umfang auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten ohne Beteiligung von TF stattfinden. Die dafür notwendige Konzentration von FVIIa liegt entsprechend den K_d -Werten ca. 100fach höher als für die Komplexbildung von rFVIIa mit TF [117]. Eine niedrigere Spanne haben wir für den Dosis-Wirkungsbereich in unserem Test gefunden: Die niedrigsten effektiven Dosen lagen bei 50 U rFVIIa/ml = 50 000 U/l. In 4,8 mg NovoSeven® (N7) befinden sich 240 000 U, 50 000 U/l entsprechen damit 1 mg rFVIIa/l. Diese 1 mg/l entsprechen bei einem MW von 50 kD einer Molmenge von 20 nmol/l bzw. einer Konzentration 20 nM, die zweithöchste verwendete rFVIIa-Konzentration von 500 U/ml somit 200 nM. Beide Konzentrationen liegen über dem physiologischen Gehalt von VII (10 nM) [120] und VIIa (0,1 nM) [120, 126] im Plasma. Basierend auf diesen Daten und Erkenntnissen sollte unser Monitoring-Test in PRP durchgeführt werden, um das individuelle hämostatische Potential möglichst realitätsnah unter Einbeziehung von thrombozytären Membranphospholipiden und niedrigen sowie hohen Dosen von Faktor VIIa zu erfassen.

Das ETP gibt die Gesamt-Thrombinbildungsfähigkeit über die fluorometrischen Messung vom Start bis zum Ende der Thrombindeaktivierung innerhalb der 66 min Laufzeit wieder. Die Variation kann dabei in einem Normalkollektiv (sogenannte „Normalresponder“) bis zu 200 % betragen [131]. Unter den hier untersuchten ETP-Normalrespondern, fanden sich identisch große interindividuelle Variationen (das 0-

2fache des Mittelwertes der maximalen Gesamtthrombinbildung, die als ETP bei 500-1000 U rFVIIa/ml gemessen wird). Der Anfang dieser Plateauphase lag für ETP und PEAK bei 100-200 U rFVIIa/ml und damit im therapeutischen Bereich [124]. Der Dosis-Wirkungskurven-Verlauf wies sigmoide Charakteristiken auf, diese beiden Parameter nahmen mit steigender Dosis nicht weiter bzw. sehr viel geringer zu, entsprechend einem pharmakologischen „ceiling-effect“. Eine Korrelation zwischen der ersten hämostatisch wirksamen rFVIIa-Dosis, d.h. dem Beginn mit überproportionaler Steigerung von ETP und PEAK (Dosis-Wirkungs-Burst), und dem absoluten Niveau des Sättigungsbereichs dieser beiden Parameter war hier nicht demonstrierbar. Das spricht für eine verschiedenartige Koppelung der maximalen Thrombinbildungsrate (PEAK) bzw. der aus allen Raten über die Messung aufsummierten Thrombinaktivität (ETP) einerseits, wie schon für TF gezeigt [151], und den thrombozyten- und gerinnungsfaktoraktivierenden Reaktionen auf RFVIIA andererseits [145, 150], auch auf der weiteren Signaltransduktionsebene [155].

Der PEAK, auch Cmax [150] genannt, beschreibt die maximale erreichte Thrombinaktivität pro Zeiteinheit. Nicht nur die Menge, sondern auch die Zeit, innerhalb der der PEAK erreicht wird (siehe auch unten TTP), spielt für die Entstehung eines initialen Gerinnsels und damit für das Stoppen einer Blutung eine entscheidende Rolle [146]. Der Aufstieg zum Plateaubereich mit steigender RFVIIA-Konzentration ist für den PEAK weniger steil als für das ETP, die sigmoide Dosis-Wirkungs-Charakteristik ist im Vergleich zum ETP vom Verlauf flacher, d. h. mit einer geringeren Steilheit der Parameterzunahme mit der Dosis. Die maximale Thrombinbildungsrate ist also über einen größeren Dosisbereich steigerbar als die Gesamtaktivität [125], was für höhere Dosen bei größeren operativen Eingriffen und schwereren Traumen spricht [127] und von Kenet [126] und Kollegen [128, 130] in der klinischen Anwendung erfolgreich praktiziert wird.

Weiterhin wiesen zwei ETP-Dosis-Wirkungskurven einen normal steilen, aber kurzen Anstieg auf ein sehr niedriges maximales Wirkungsniveau auf (sogenannte Low-Responder), was sich aber nicht in korrespondierenden PEAK-Werten niederschlug [Figg. 1.1 (a), 1.2(a); Kapitel Ergebnisse]. Diese waren nicht aus den anderen Werten des Probandenkollektivs hervorgehoben, was eine normale Dynamik der

Thrombinbildung bei erniedrigtem Gesamtpotential (ETP) anzeigt, aber nicht mit klinischen Auffälligkeiten korreliert war. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits gemacht und in der „rFVIIa extended use database“ (Traumanet, GB) dargelegt [129].

Der Verlauf der Thrombinbildung [Fig. M2, Kapitel Methoden] lässt sich zeitlich in 3 Phasen der Aktivierung und eine der Deaktivierung des gebildeten Thrombins unterteilen. So lassen sich eine Initiations-, Amplifikations-, Propagations- und Deaktivierungs- oder Terminationsphase unterscheiden. Während nur Initiations- und Amplifikationsphase in der Lag-Time (LT) abgebildet werden, findet sich die anderen beiden zusätzlich in der TIME TO PEAK (TTP) wieder (siehe unten, Absatz TTP) [48].

Die Lag-Time stellt die Zeit von der Zugabe der Calciumionen, zusammen mit dem Fluoreszenzfarbstoff, bis zum Beginn der exponentiellen Steigerung der Thrombingenerierung (auch Thrombinburst genannt) dar. Sie ist damit ein Hinweis, wie schnell das hämostatische Potential einer Probe in der Lage ist, die Vorbereitung für den Thrombinburst zu leisten. Daher korreliert sie zeitlich näherungsweise mit der klinischen Blutungszeit. Die LT-Werte der Probanden haben im Gegensatz zum ETP und PEAK in ihren Verläufen eine geringere Variationsbreite, von 200 U/min rFVIIa an reagiert die LT nur noch mit geringgradiger Verkürzung auf höhere rFVIIa-Konzentrationen und weist damit ein nach unten begrenztes Reduzierungspotential im Sinne einer unteren Schwelle auf. Die Gerinnungsreaktionen innerhalb der LT führen nur zu geringer Thrombinbildung im Bereich von ca. 2 nM [132]. Diese geringe Menge entspricht weniger als 5 % des während des gesamten Gerinnungsvorgangs gebildeten Thrombins und korreliert nicht zwangsläufig mit der Hauptmenge von mehr als 95 % des gebildeten Thrombins aus denjenigen Phasen der Thrombinbildung, welche der LT folgen. Für die maximale Geschwindigkeit der Aktivierung dieser begrenzten Menge an Gerinnungsfaktoren, die für die initiale Thrombinbildung während der LT benötigt wurde, scheint bereits eine geringe Menge an rFVIIa ausreichend [153]. Die LT hat bezüglich der Menge und Aktivität des während des Hämostasevorgangs gebildeten Thrombins den Charakter einer Latenzzeit. Weiterhin liegt ein Wirkungsschwerpunkt dieser Thrombinspuren in der rezeptorvermittelten Signaltransduktion auf interner thrombozytärer Ebene. Dieses

spricht für eine von der Menge des gebildeten Thrombins weniger abhängige Reaktionsfolge, die sich nach Erreichen einer Schwelle nur noch schwach verändert [155, Figg. 1.3 (a), 1.3 (b)]. Dadurch und durch die geringe Menge an gebildetem Thrombin erscheint die LT bei gesunden Probanden konstanter und weniger beeinflussbar durch rFVIIa als die Summe (ETP) und Dynamik (PEAK) der Thrombinbildung. Die LT ist, vor allem bei niedrigen TF-Werten wie bei den Ansätzen in Versuchen hier, von freiem TFPI, freiem PS, FIX and Fibrinogen abhängig [134].

Die TIME TO PEAK (TTP) benennt die Zeit von der Gerinnungsauslösung durch die Calciumionen bis zum Maximum der Thrombingenerierung pro Zeit (Thrombingenerierungsrate). An diesem Punkt ist die Thrombindeaktivierung oder Terminationsphase, die schon während der Propagation beginnt [148], gleich mit der Thrombingenerierung. Daher führt eine verzögerte Thrombinaktivierung auch zu einer verzögerten Deaktivierung und damit zur Verlängerung der TTP, welches sich in einer verlängerter Blutungszeit niederschlägt. Die TTP sinkt zwischen 100 und 200 U/ml, das entspricht dem therapeutisch am häufigsten verwendeten Bereich, schwächer als die LT bei geringerer relative Spannbreite (Variationsbreite) der Werte aller Probanden (2fach gegenüber 4fach). Eine Erklärung wäre der größere Einfluss von FVIIa auf die Generierung der Hauptmengen der Faktoren Va, VIIa und XIa (welche für die Erzeugung des größten Teils von aktivem Thrombin nötig sind), als auf die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin durch Faktor Xa in der exponentiellen Thrombinbildungsphase (Burst nach der LT bis hin zum Erreichen der TIME TO PEAK) [131, 132]. Andere Autoren [133] fanden die Variationen der TTP (12 %) nur geringfügig unterschiedlich zu denen der LT (10%). Zum anderen ist der Einfluss von FVII als früh in der Gerinnungskaskade wirkender Faktor auf die LT systembedingt größer [D 4, D 34]. Der gemessene geringe Unterschied kann außerdem an der Verwendung von PPP anstelle von PRP als Plasma liegen, da hier keine Einflüsse durch die Reorientierung („scrambling“) der im ruhenden Thrombozyten asymmetrisch verteilten Membranlipide [156] sichtbar werden, und die hinzugegebenen Phospholipide hingegen bereits aktivierte Membranen simulieren. Damit wird der Prozess der thrombozytären Membranaktivierung nicht erfasst [157].

Die enormen interindividuellen Variationen, die sich in einzelnen Unterparametern der Thrombinbildung (ETP, PEAK, TIME TO PEAK, LAG TIME) sowie primären und sekundären hämostatischen Parametern finden, korrelierten nicht mit einem bestimmten klinischen Phänotyp [134]. So zeigte keiner unserer untersuchten Probanden eine offensichtliche oder klinische Blutungsneigung. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Variationen, besonders wenn sie nur einen einzigen TGT-Parameter betreffen, mit Vorsicht interpretiert werden sollten. Zusammenfassend betrachtet erschweren die individuell sehr heterogenen Merkmale der TGT-Parameter bzw. der Thrombinbildung die Erstellung und die klinisch sinnvolle Verwendung von Standardkurven, wie wir sie von den etablierten Gerinnungstesten mit ihrer guten Reproduzierbarkeit und eingeschränkten physiologischen Relevanz kennen [111, 131, 135].

Die Ermittlung individueller, patientenspezifischer maximaler und verlaufstypischer Referenzparameter durch in-vitro Spiken von Patientenproben ist praktisch betrachtet einfacher durchzuführen, da keine Standardkurven benötigt werden. Im Gegenzug sind vor Behandlungsstart zu ermittelnde Referenzwerte unerlässlich. Die erscheint im Hinblick auf die erwähnte Vielfalt der Dosis-Wirkungs-Charakteristiken adäquater [115, 135, 136]. Den neueren Anforderungen an individuell angepasste Behandlungen bzw. Therapien, die so genannte personalisierte Medizin, kann mit Hilfe des TGT und seiner Korrelation mit der Klinik besser begegnet werden, wenn unter diesen Maßgaben personenspezifisch aus den Dosis-Wirkungsverläufen für rFVIIa:

- das maximale TGT-Referenzwerte im Sinne von maximalen hämostatischen Potentialen,
- der Beginn der Gefahr von thrombotischen Nebenwirkungen bzw. von Blutungen,
- die Dosen für ausreichende rFVIIa-Wirkung,
- die Parametergewichtung nach der klinischen Fragestellung

für jeden Patienten individuell festgelegt werden [147].

Mit der so entwickelten Methode sollte untersucht werden, ob sich bei der klinischen

Behandlung mit NovoSeven® der in vivo beobachtete hämostatische Effekt, also Blutungszeitverkürzung und Blutungsstillung, sich auch in-vitro beobachten lässt. Ziel ist, eine individuelle Dosis-Wirkungs-Beziehung in-vitro zu bestimmen und zu überprüfen, ob sie mit der in vivo gemessenen Beziehung übereinstimmt.

Die weitere Validierung des TGT haben wir im PRP von Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann (TG) bei einer Familie mit fünf homo- und heterozygot betroffenen Mitgliedern (T1-5) durchgeführt. Die klinisch manifeste Blutungsneigung vor allem in Haut und Schleimhäuten besteht aufgrund der verminderten Fibrinogenbindung an den veränderten Gp IIb/IIIa-Rezeptor von TG-Patienten. Die daraus folgende beeinträchtigte Fibrinnetz-Blutzellen-Geflechtbildung ist thrombozytär bedingt [158]. Die Gerinnungszeiten der plasmatischen Teste bewegen sich hingegen im Normbereich. Als Labormethoden stehen zur Diagnosesicherung die Aggregometrie [159] und die Messung der fehlenden Fibrinogenbindung mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS, eine fluorometrische Methode) [160] zur Verfügung. Die Thrombozyten der TG-Patienten können nicht aggregieren, binden aber an Kollagen und Thrombin und lassen sich durch rFVIIa und dadurch gebildetes Thrombin, auch TF-unabhängig, aktivieren [165, 166]. Der Einsatz des TGT als Test, der Plättchen einschließt, liegt damit nahe, da die klinisch beobachtete Verkürzung der Blutungszeit unter Einsatz von rFVIIa nur in Testen, die Thrombozyten mit einschließen, gemessen werden kann.

Das ETP unserer heterozygoten TG-Patienten unter rFVIIa liegt durchweg höher als bei den gesunden Probanden [Ergebnisse Figg. 1.1. a+b), Fig. 4.1. a); 4.1.1. a)] und hat eine den Normalpersonen vergleichbare interindividuelle Schwankungsbreite. Bei den homozygoten TG-Patienten liegen die Werte im Normalbereich. Über plasmatische Kompensationsmechanismen, die den thrombozytären Funktionsdefekt kompensieren, gibt es keine direkten Hinweise in bisher veröffentlichten Untersuchungen. In einer früheren in-vitro Untersuchung mit mehreren Gp IIb/IIIa-Antikörpern wurde eine maximal 50 % reduzierbare Thrombinbildung festgestellt [161], in einer ex-vivo-Untersuchung ergaben sich übereinstimmende Senkungen [162]. In einer früheren Arbeit konnten wir zeigen, dass sich ein über TF-Initiation generiertes ETP nur zu ca. 20 % unter Abciximab, einem Gp IIb/IIIa-Antikörper,

senken lässt [163]. Da dieser Antikörper eine der Thrombasthenie Glanzmann vergleichbare Wirkung auf die Gerinnungsvorgänge erzielt, spricht dieses für einen geringen Einfluss der Gp IIb/IIIa-vermittelten thrombozytären Effekte auf das endogene Thrombinpotential. Die ETP-Einzelprofile sind eher homogen mit Ausnahme von Patient T3. Dieser ist, obwohl heterozygot, gegenüber den gesunden Vergleichspersonen erhöht. Dafür käme ein vermehrter Besatz mit thrombinbindenden (GPIaIIa, GPVI, GPIb-IX-V) oder thrombinaktivierten Rezeptoren (PAR1, PAR4) in Frage, ebenso wie durch Recycling der Integrinrezeptoren diesbezüglich normal konstituierte intrathrombozytäre alpha-Granula [167]. Letzteres führt, bei vorhandener Restfibrinogenbindungsfähigkeit des Rezeptors, über die Präsentation von mehr Rezeptoren zu einer zu einer stärkeren Konzentration von Fibrinogen und damit von Fibrin und daran gebundenem Thrombin am Läsionsort.

Der PEAK steigt mit der Dosis weniger steil an als das ETP: Von 50 bis 500 U rFVIIa/ml steigt das ETP auf das Sieben-, der PEAK auf das Vierfache, wenn man die Mediane der fünf Patienten betrachtet. Der 50 U/ml-Wert und damit auch die relative Zunahme von ETP und PEAK hängt dabei zum einen der Voraktivierung bzw. Aktivierbarkeit der Thrombozyten ab. Andererseits zeigen die homozygoten Patienten stets eine niedrigere relative Steigerungsfähigkeit dieses Parameters. Der zugegebene rFVIIa generiert in Übereinstimmung mit der so erzeugbaren prokoagulatorischen Aktivität und Signalverstärkung der Plättchen größere Mengen von Faktor Xa, welche das vorhandene Prothrombin zwar schneller konvertieren können, aber über die Prothrombinmenge begrenzt sind [164]. Der PEAK der heterozygoten Patienten weist normale Werte (Fig. 4.1.1. b) auf, derjenige der homozygoten Patienten T3 und T4 reicht an der unteren Normalpersonenbereich heran und ist damit, obwohl im unteren Bereich der gesunden Kontrollen, deutlich von den anderen drei heterozygoten Patienten abgesetzt. Diese drei sind ebenfalls erhöht gegen die Werte der gesunden Probanden, wofür die bereits für das ETP genannten Kompensationsmechanismen ebenfalls in Frage kämen. Dieses könnte an noch nicht ausreichend aufgeklärten, sowohl thrombozytären wie plasmatischen Kompensationsreaktionen liegen [168, 169].

Die LT-Veränderung ist für alle fünf TG-Patienten der Familie durch einen starken

initialen (von 50 auf 100 rFVIIa U/ml) Abfall gekennzeichnet, danach folgt der Übergang in einen zweiten Bereich langsameren Rückgangs, der mit seiner linear bis halblogarithmisch fallenden Charakteristik von dem eher exponentiellen Abfall der gesunden Kontrollen (Fig. 1.3. b) ab. Die hetero- und homozygoten Patienten unterscheiden sich in diesem Parameter von der Charakteristik noch vom Messwertebereich her, was nahelegt, dass der defekte Fibrinogenrezeptor und die dadurch veränderte Signaltransduktion sich über diesen Parameter nicht diagnostisch verwerten lassen. Dieser zweistufige Phasenverlauf tritt bei den meisten gesunden Probanden ebenfalls auf (Fig. 4.1.1. c). Legt man eine Kompensation des defekten bzw. vermindert exprimierten Fibrinogenrezeptors durch das GP Ib-V-IX, einen Kollagen- und Thrombinrezeptor, zugrunde [169], so erscheint das Ausbleiben des schnellen initialen Abfalls der LT und die resultierende Linearisierung der LT-Dosis-Wirkungskurve als Ausdruck der geringergradigen Kompensation. Diese tritt stärker zutage im unteren Dosis-Wirkungsbereich als im oberen, in dem mehr gebildetes Thrombin die Kompensation auch über diesen Rezeptor unterstützen kann [164]. Klinisch tritt eine ebenfalls dadurch vermehrte Fibrinbildung am Ort der Läsion unter rFVIIa über die Bindung von vWF und damit Thrombozyten als hämostasefördernder Mechanismus auf [169].

Die Medianzeiten der TTP sind bei vergleichbar sigmoider Charakteristik (Fig. 4.1.1. a) durchweg verlängert gegenüber den gesunden Probanden, für die homozygoten Patienten mehr als für die heterozygoten. Letztere zeigen zumindest im höheren rFVIIa-Konzentrationsbereich durchgehend kürzere Zeiten als die heterozygoten, was im Gegensatz zur LT für den Einfluss des pathologischen Fibrinogenrezeptors. Die Charakteristik erscheint ähnlich wie bei der LT biphasisch. Die kleinere Signalspannbreiten von LT und TTP sowie deren ähnliche Variabilität von ca. 200 % über alle Werte für alle Patienten spricht für eine schwächere Beeinflussbarkeit der zeitlichen Abfolge des Thrombinaktivierungsverlaufs, was sich vor allem bei den höheren rFVIIa-Konzentrationen bemerkbar macht.

Die Thrombozytenvoraktivierung (Wert ohne rFVIIa-Zugabe) ist im ETP nur für die zwei heterozygoten, nicht aber die homozygoten Patienten präsent und relevant. Da diese Voraktivierung von Katecholaminen [172] und anderen Signalmolekülen wie

ADP [170, 171] beeinflusst wird, erscheinen die Plättchen der heterozygoten damit eher wie die der gesunden Probanden und die der homozygoten relativ inert. Die Plättchenaktivierbarkeit durch mechanische Beeinflussung [214] bei der Blutentnahme und Stress [172, 213] könnte daher auch über den Fibrinogenrezeptor [196] beeinflusst werden.

Die Zusammenfassung von hetero- und homozygoten Patienten in Boxplots wurde zur Darstellung der Spannweite der Werte von Thrombasthenie Glanzmann-Patienten gewählt, da bei der Diagnosestellung der Genotyp meist noch nicht bekannt ist. Daher ist es hilfreich, die Spanne für die möglichen zu erwartenden Werte abzuschätzen. Der Test konnte Unterschiede in der Bildung aktiven Thrombins zwischen hetero- und homozygoten TG-Patienten darstellen, so sind die Messwerte der Zeitparameter LT und TTP für die homozygote Patienten stets länger als für 2 der 3 heterozygoten Patienten. Der Unterschied der heterozygoten Patienten zu den Gesunden ist nicht signifikant.

Zieht man die Veränderung der Parameter und die funktionelle Beeinträchtigung des Rezeptors der homozygoten Patienten gegenüber den heterozygoten als Surrogatparameter für die Schwere der Klinik heran, stellen sich unsere homozygoten Patienten in Übereinstimmung mit den TGT-Werten entsprechend schwerer dar, d. h. mit häufigeren und schwereren Blutungen.

Zur Beurteilung der Bedeutung der TGT-Ergebnisse wurden die Glanzmann-Patienten mittels der FACS-Analyse untersucht. Außer den drei heterozygot und den zwei homozygot betroffenen Mitgliedern der Familie T. beinhaltet dies auch die Patientin EG, die ebenfalls homozygot betroffen ist, aber für eine andere Mutation (s. Ergebnisse, Punkt 4.2 ff). Die Untersuchungen für Familie T. wurden in-vitro durchgeführt, bei Patientin EG auch perioperativ und 2 h nach dem Eingriff. Im Vergleich mit der Aggregation als früher etablierter Methode zur Diagnose [175] der Thrombasthenie Glanzmann erlaubt FACS eine präzisere Erfassung dieser Erkrankung über eine Differenzierung nach Bindungskapazität, Rezeptorbesatz, TG-Geno- und Phänotyp sowie aktiviertem und nichtaktiviertem Rezeptor. Außerdem berücksichtigt FACS die für die Hämostase wichtigen Thrombozytenfunktionen [173, 174]. Zur deren Charakterisierung werden mit der FACS-Methode die Bindungsfähigkeit an die

extrazelluläre Matrix, die Präsentation prokoagulatorischer Membranlipide und die Signalvermittlung mittels thrombozytensezernierter Moleküle untersucht und hier als etablierte Thrombozytenuntersuchungs-Methode zum Vergleich mit der Thrombinbildung herangezogen.

Die Bestimmung der Annexin V-Bindung an die Plättchen mittels FACS stellt einen Surrogatparameter für die Membranaktivierung der Plättchen (PS, PE) [156] dar, auch nach Stimulation durch rFVIIa [178]. Der Verlauf der Annexin-V-Bindung mit der rFVIIa-Konzentration (Fig. 4.1.2. a) unterscheidet, ähnlich wie die Thrombinaktivität im ETP, die homozygoten Patienten von den heterozygoten und die ihnen sehr ähnliche Normalkontrolle, dabei ist, abweichend von den Homozygoten der Familie T., die Bindung bei Patientin EG normal. was bei Ihr (Fig. 4.2.1. g) auf eine normale Fähigkeit zur PS- und PE-Membranlipid-Exposition der TG-Patienten durch rFVIIa hinweist [168]. Insgesamt ist der Membran-Flipflopmechanismus der Aktivierung zwar bei homozygoten TG-Patienten beeinträchtigt, aber residual vorhanden und aktivierbar.

Die Fibrinogenbindungsfähigkeit der Plättchen konzentriert deren prokoagulatorische Aktivität am Läsionsort und ermöglicht die Gerinnselretraktion („clot retraction“) beim Wundverschluss [185]. Unter ADP-Stimulation kann die Charakteristik der Bindung den Rezeptorbesatz und Funktionsunterschiede zwischen gesunden Probanden, heterozygoten und homozygoten TG-Patienten der Familie T. mit weniger als 5 % Rezeptorbesatz (Typ I Glanzmann) [179] und ihrer Klinik aufdecken. Auch bei Patientin EG als homozygoter TG-Patientin Typ I ist die Fibrinogenbindung auf ADP-Stimulation nicht nachweisbar. Bei intakten ADP-Rezeptoren und einer verminderten Fibrinogenbindung wäre eine fehlende Verstärkung der Signaltransduktion durch das defekte oder unterexprimierte Gp IIb/IIIa als Ursache denkbar, umgekehrt auch die verminderte Aktivierbarkeit des Fibrinogenrezeptors und der Thrombozyten [180, 181, 182, 183] auf ADP-Rezeptor-vermitteltes „Outside-In-Signaling“ [187].

TRAP wirkt als PAR1-Agonist wie das beim Gerinnungsvorgang in geringer Menge initial gebildete Thrombin und aktiviert bei Gesunden die Fibrinogenbindungsfähigkeit [185, 204, 205] auch nach rFVIIa-Zugabe [215]. Die Schwellenkonzentration dafür

liegt relativ höher als bei ADP (Fig. 4.1.2. b+c), da diese Aktivierung auf die Verstärkung durch thrombozyteninternes ADP angewiesen ist [184, 186]. Die Dosis-Wirkungskurven für die Fibrinogenbindung der TG-Patienten reagieren übereinstimmend auf TRAP und ADP, und verlaufen analog zu den ETPs unter rFVIIa. Sie zeigen ebenfalls einen Unterschied für homo- und heterozygote TG-Patienten der Familie T. Auch bei Patientin EG lässt sich eine mit TRAP über PAR1 ausgelöste thrombozytäre Fibrinogenbindung nicht nachweisen (Fig. 4.1.2. b). Daher kann diese nicht für die klinischen beobachteten hämostatischen Effekte von rFVIIa bei EG verantwortlich sein.

Das CD-62-Antigen zeigt die stimulationsabhängige granuläre Sekretion [188], welche neben der Aggregation [173, 193], Adhäsion [188, 191], Fibrinogenbindung [189] der Freisetzung von Faktor V [189] und prokoagulatorischen Lipiden [192] die Freisetzung von Gp IIb/IIIa [190] moduliert. Mittels der Dosis-Wirkungscharakteristik der CD-62-Expression nach Aktivierung der Thrombozyten durch TRAP [194] können die homozygoten Patienten nur unzureichend von den Kontrollen und den heterozygoten differenziert werden (Fig. 4.1.2. d) [209, 210]. Unter ADP lassen sich die homozygoten Patienten der Familie T. dagegen deutlicher als bei TRAP abgrenzen, (Fig. 4.1.2. e). analog zur Fibrinogenbindung. Für die diagnostisch verwertbare Abhängigkeit der gestörten Sekretion von einem homozygoten M. Glanzmann kommen eine reduzierte Thrombozytenaktivierung durch ADP, den P2Y₁₂-Rezeptor und höhere intrazelluläre Calciumspiegel [195, 191] durch verminderte Gp IIb/IIIa-vermittelte interne Verstärkung (inside-in-Signaling) in Frage. Hinweise auf eine solche Modulation finden sich in einer Arbeit über bidirektionale Signaltransduktion des Gp IIb/IIIa-Rezeptors [197]. Bei der GT-Patientin EG lässt sich ebenfalls ein Gp IIb/IIIa-unabhängiges, PAR1-vermitteltes Rest-Sekretionspotential [209, 210] nachweisen. Die Reaktionsträgheit auf ADP [211] und die stärkere Residual-Sekretion auf TRAP gegenüber ADP bei EG (Fig. 4.2.1. c+d) und den untersuchten Glanzmannpatienten spricht daher für den Einsatz von rFVIIa als Medikament, welches die Thrombinaktivität und damit das Hämostasepotential erhöhen kann.

Im TGT schlägt sich die aufgrund der Thrombasthenie Glanzmann veränderte

Plättchenphysiologie im verminderten ETP und PEAK nieder, deutlich stärker für die homozygoten als für die heterozygoten Patienten (Fig. 4.1.1. a-d), die der Klinik entsprechend im Bereich der Normalwerte (Fig. 1.1. a-d) gemessen werden. Analogie zum FACS besteht bei den Dosis-Wirkungs-Kurvencharakteristiken (Annexin-V, TRAP) und der Differenzierbarkeit heterozygoter sowie homozygoter Patienten (ADP). Eine Verstärkung der plättchengebundenen Hämostasevorgänge durch die Wirkung von rFVIIa über sekundär gebildetes Thrombin wäre damit bei TG-Patienten durch den TGT erfassbar. Das FACS erfasst dieses Potential unter TRAP unvollständig, da die Thrombinbildung statt von PAR1 eher abhängig von PAR4 [205] und GpIb-V-IX [169], VI und Ia/IIa [167] ist. Bei den homozygoten TG-Patienten der Familie T. mit weniger als 5 % Rezeptorbesatz (Typ 1) zeigen TGT- und FACS-Parameter die Störung eines gemeinsamen thrombozytären Aktivierungsweges, besonders unter ADP direkt oder aus thrombozyteneigener Freisetzung. Das ETP-Sättigungsplateau von EG, den homo- und den heterozygoten Patienten der Familie T. wird schon ab 100 U rFVIIa/ml erreicht. Die maximale Thrombinbildungsrate (PEAK) verhält sich hier ab 200 U/ml analog zum ETP. Die Präsentation prokoagulatorischer Aktivität auf der Außenseite der Thrombozyten unter rFVIIa erhöht also nicht nur das Thrombinpotential, sondern gleichzeitig auch die Dynamik der Thrombinaktivierung. Dies ist für eine schnell folgende Gerinnselformung und Blutungsstillung wichtig. Die Änderung von LT und TTP ist aber so gering, dass eine Einbeziehung in die TGT-Interpretation und die Korrelation mit thrombozytären Aktivitätsmarkern im FACS hier problematisch erscheint. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung der rFVIIa-Wirkung im TGT zeigt sich bei Patientin EG und den anderen Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann am besten bei PEAK und ETP.

Zur Untersuchung der Kinetik der rFVIIa-Wirkung haben wir für mehrere Zeitpunkte nach iV-Bolus-Gabe bei einer Patientin mit Thrombasthenie Glanzmann den TGT mit der Durchflusszytometrie (FACS) verglichen. Die Halbwertszeit des Plasmaspiegels von rFVIIa liegt für Gesunde bei 2,7-4,1 h [198] und bei 2,7-3,1 h in Hämophilie A-Patienten [199]. Eine nach einmaliger intravenöser Gabe anhaltende Wirkung wäre demnach bei Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann auch im Halbwertszeitraum nach der Gabe zu erwarten.

Bei der Patientin EG wurde das Monitoring der Gerinnungsaktivität von rFVIIa mit FACS und TGT vor und nach Gabe im Rahmen einer zahnärztlichen Behandlung durchgeführt. Damit wurde bei einer Patientin mit einem zur Familie T. unterschiedlichen Glanzmann-Geno- und -Phänotyp (s. Ergebnisse, 4.2) eine vergleichende Validierung des TGT mit der Durchflusszytometrie durchgeführt. Dabei wurde zusätzlich der PAC1-Antikörper zum spezifischen Nachweis der Fibrinogenbindung an den aktivierten Rezeptor eingesetzt, der an ein im nichtaktivierten Zustand verborgenes Epitop des Gp IIb/IIIa bindet [173, 193]. Zusätzlich ermöglichte die Zahnbehandlung bei der Patientin EG das Monitoring der Kinetik der Wirkung von NovoSeven, da das Medikament vor und nach der Behandlung angewendet wurde, während die Messungen vorher bei Familie T. reine in-vitro Funktionsuntersuchungen waren. Die rFVIIa-Wirkung zeigte klinisch schon mit der ersten Gabe vor und der zweiten 15 min nach dem Eingriff den gewünschten hämostatischen Effekt. Dass Bolusgaben nach dem internationalen rFVIIa-GT-Register [217] sowie vorliegenden Untersuchungen [206] am effektivsten sind, wenn sie möglichst früh erfolgen, konnte hier bestätigt werden. Die Dosierung mit 110 µg/kg war für diesen Eingriff [219, 206] nach der im internationalen Anwendungsregister [217] empfohlenen Menge ausreichend was die geplante dritte Bolusgabe entfallen ließ, da keine Nachblutung mehr nach dem Bolus 15 min nach Behandlung auftrat und postinterventionelle Gaben nur bei Nachblutungen indiziert sind [217]. Die nach 2 h nachweisbare Restwirkung der vorhergehenden rFVIIa-Gabe korrelierte mit einem ETP und PEAK bei der Patientin über alle in-vitro Dosen bei ca. 90 % der 15-min Werte und zeigt die Übereinstimmung von TGT und klinisch-hämostatischer Situation. Der TGT eignet sich daher zum Monitoring dieser therapeutischen Anwendung von rFVIIa. wie sie, für Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann beschrieben ist [128, 159, 201, 202, 206-208].

Die Fibrinogenbindung zeigt weder nach Aktivierung durch ADP noch mit TRAP eine Wirkungskinetik über die Anwendungszeitpunkte an (Fig. 4.1.2. b). Allerdings bewirken supratherapeutische in-vitro zugegebene rFVIIa-Konzentrationen eine CD62-Expressionssteigerung (Fig. 4.2.1. e), deren Stärke nach der ersten in vivo-Bolusgabe zunimmt und dessen rFVIIa-Schwellendosis durch diesen Bolus gesenkt wird. Dieser Hochdosis-Effekt hält auch nach 2 h nachweisbar an, wurde bereits nach

einem therapeutischen Einsatz beschrieben [212], und zeigt einen potentiellen therapeutisch relevanten Effekt für ansonsten aktivierungsresistente Plättchenphänotypen, der aufgrund der fehlenden Nachblutung über die HWZ hinausgeht.

Auch die Bereitstellung prokoagulatorischer Aktivität über PS und PE auf der Außenseite der Thrombozytenmembran wird durch die Bolusgabe von rFVIIa gesteigert (Wert 2.), hält auch 2 h nach Gabe (Wert 3.) an und ist so am ehesten für die thrombozytenabhängige hämostatische rFVIIa-Wirkung verantwortlich, auch in-vitro, unabhängig von der rFVIIa-Bolusgabe. Das so gesteigerte hämostatische Potential bleibt auch bei den homozygoten in geringerem Umfang über den HWZ-Zeitraum erhalten, und trägt damit zur erwünschten Blutungsvermeidung bei.

Das ETP-Sättigungsplateau ab 100 U rFVIIa/ml ist 15 min nach der Bolusgabe nur noch stark abgeschwächt darstellbar (G. 2.), da das ETP-Basisniveau durch die rFVIIa-Wirkung der Bolusgabe auch ohne zusätzlichen rFVIIa angehoben ist. Die klinisch bereits durch die erste rFVIIa-Bolusgabe erzielte Hämostasefähigkeit stimmt mit dieser Anhebung, die analog zur Wirkung des Bolus auch nach 2 h anhält (G. 3.), und der Verschiebung der Annexinbindung auf ein anhaltend hohes Niveau überein (Fig. 4.2.1. e). Dies ist für die Verhinderung des Verlustes größerer Blutvolumina, wie sie bei Blutungen in Hohlorgane und andere Körperhöhlräume entstehen kann, von praktischer sicherheitsrelevanter Bedeutung. Die maximale Thrombinbildungsrate (PEAK) verhält sich hier analog zum ETP, auch was die wirkungskinetischen Aspekte angeht. Die Änderung von LT und TTP ist so gering, dass eine Einbeziehung in die TGT-Interpretation und die Korrelation mit thrombozytären Aktivitätsmarkern im FACS hier problematisch erscheint. Die Dosis-Wirkungs-Beziehung der rFVIIa-Wirkung im TGT zeigt sich bei Patientin EG und den anderen Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann am besten bei PEAK und ETP, auch 2h nach der Bolusgabe.

Der Rezeptor-Restbesatz Patientin EG liegt zwar unter 5 %, hat aber eine andere zugrundeliegende Mutation als diejenige aus der TG-Familie, was eine diverse Funktionalität der Gp IIb/IIIa-Rezeptoren und die variablen ETPs bedingt. Die schwache Sekretion nach Stimulation aller untersuchten Glanzmann-Patienten zeigt

die schwere Beeinträchtigung dieser prokoagulatorischen Thrombozytenfunktion. Nur über die CD62-Expression ist die Sekretion bei Ihnen nennenswert nachweisbar, sie kann bei den homozygoten der Familie T ausschließlich mit TRAP, bei Patientin EG nur mit rFVIIa induziert werden. Die dosisabhängige, quasinormale Zunahme der Annexinbindung (PS, PE) [156,176] auf rFVIIa und zeigt die Induzierbarkeit prokoagulatorischer Aktivität an, die sich bei der Beobachtung der Zahnextraktion eine therapeutische Wirksamkeit von rFVIIa in der verhinderten Nachblutung äußert. Abgesehen von individuell variablen, vom Genotyp abhängigen Ausmaß bleibt aber den homozygoten TG-Patienten eine Restaktivierbarkeit der hämostatischen Beteiligung der Thrombozytenfunktion. Für die heterozygoten Patienten ist die Situation fast gleich zu den Gesunden der Normalkontrollen.

Die Pharmakokinetik von rFVIIa wird im pharmakoökonomischen Sinne relevant, wenn im Rahmen einer operativen oder prophylaktischen Anwendung die Entscheidung zur erneuten Gabe ansteht [126, 201]. Dieses ist sowohl unter Nebenwirkungs-, vor allem aber unter Kostengesichtspunkten bei rFVIIa ein entscheidendes Kriterium, da die Kosten einer Einmalbolusgabe für einen 70 kg schweren Patienten je nach klinischen Erfordernissen (Epistaxis: ab 50 µg/kg Körpergewicht [202], Polytrauma: bis 270 µg/kg Körpergewicht [126]) zwischen ca. 2.850 und 15.200 EUR liegen [203]. Die in unserer Studie untersuchte Patientin EG wiegt 65 kg, für den Eingriff wurden 110 µg/KG angesetzt [202], damit liegen die Kosten pro Bolus bei 5.700 EUR.

Insgesamt betrachtet hat sich der TGT hier als Methode erwiesen, welche die hämostatische Wirkung von rFVIIa bei Thrombozytenfunktionsstörungen nicht nur qualitativ, sondern auch in unterschiedlichen Schweregraden und damit mindestens semiquantitativ und zeitaufgelöst erfassen kann. Das primäre Ziel - Monitoring von rFVIIa - wie auch das sekundäre Ziel, rFVIIa-Monitoring für Thrombasthenie Glanzmann-Patienten, wurde erreicht. Die erforderliche Anwesenheit von Thrombozyten beim TGT bedingt, dass die Blutprobe nur bis zu einige Stunden nach Probenentnahme verarbeitet werden kann. Dies lässt einen Routineeinsatz des TGT hauptsächlich in hämostaseologischen Behandlungszentren zu. Bei plasmatischen Störungen und gleichzeitig intakter Thrombozytenfunktion ist der Einsatz von PPP

möglich, was durch die verbesserte Lagerungs- und Transportfähigkeit von PPP den Anwendungsbereich erweitert. Die Kombination des TGT mit anderen zellbasierten, Methoden wie der Durchflusszytometrie erlaubt eine detaillierte und präzise molekulare Differenzierung ähnlich erscheinender Pathologien und Phänotypen, vor allem derjenigen, die durch eine veränderte Wechselwirkung zwischen Thrombozyten und faktorieller Gerinnung ihre klinische Realität entfalten. Mit dem TGT kann nicht nur, wie mit FACS, die Pathophysiologie der Plättchen beschrieben, sondern auch die individuelle Dosierung bzw. das Monitoring einer hämostatischen Therapie durchgeführt werden. Dies ermöglicht einen Schritt hin zur personalisierten Medizin mit weniger Nebenwirkungen und besserer Ökonomie der Therapie.

Zusammenfassung

Bisherige zellfreie Labormethoden und in-vitro-Diagnostik zielen darauf ab, die Zeit von der Auslösung der Gerinnung bis zur Gerinnungsbildung zu messen. Sie sind aber nicht für die Messung der Wirksamkeit von rFVIIa als Medikament geeignet, das für seine hämostatische Wirksamkeit die Funktionen von Blutzellen, besonders Plättchen, benötigt. Außerdem erfassen diese Gerinnungsteste nur einen bestimmten Abschnitt der Gerinnung und ein Zeitablauffenster, welches einen geringen Anteil ($\leq 5\%$) des insgesamt gebildeten Thrombins erfasst und die Dynamik der Thrombingenerierung unberücksichtigt lässt. Die Plättchen und ihre Physiologie spielen aber die Hauptrolle in der Phospholipid-Präsentation die auf der Plättchenmembran erfolgt. Dies ist Voraussetzung für eine individuell ausreichende Thrombinbildung. Die Erfassung des endogenen Thrombinpotentials (ETP) in plättchenreichem Plasma, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, überwindet diese methodischen Nachteile der etablierten Tests. Damit lässt sich eine individuelle Wirkungs- und Risikovorhersage erstellen, da hämostaserelevante Charakteristika wie z.B. Erkrankungen, Komedikation, Geschlecht, Umwelt- und lebensstilabhängige Faktoren, in die Untersuchungen einbezogen werden.

In dieser Arbeit wurde mit dem Thrombingenerierungstest (TGT) eine Methode etabliert und evaluiert, die inter- und intraindividuellen Unterschiede in der Thrombinbildung in plättchenreichem Plasma (PRP) zeigt. Ausgehend von den dargestellten in-vitro Ergebnissen mit gesunden Probanden wurde die Wirksamkeit von rFVIIa im TGT, zusätzlich vergleichend und validierend mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS), bei Patienten mit Thrombasthenie Glanzmann untersucht. Diese sind aufgrund einer thrombozytenfunktionsstörungsbedingten Blutungsneigung in den plasmatischen Gerinnungstesten unauffällig. Evaluiert wurden hetero- und homozygote Patienten mit unterschiedlichen zugrundeliegenden Mutationen. Zuerst wurden Proben von einer Familie in-vitro untersucht, dann eine Patientin, die im Rahmen eines zahnärztlichen Eingriffs (ex-vivo-in-vitro) unter Einbindung der klinischen Beobachtung überwacht wurde.

Der TGT zeigt eine deutliche prohämostatische Wirksamkeit von rFVIIa bei allen Probanden und Patienten, FACS erfasst die zugrundeliegenden Zellfunktionen. Dabei

werden Unterschiede zwischen gesunden Probanden, heterozygoten und homozygoten Patienten aufgezeigt, die diagnostisch und therapeutisch verwertbar sind. Unterschiedliche Mutationen und weitere ursächliche thrombozytäre Mechanismen schlagen sich in entsprechenden Änderungen der gemessenen FACS-Parameter nieder, die zum großen Teil mit den TGT-Werten für ETP und PEAK korrelieren. Die TGT-Werte zeigen, gerade für die Patientin EG, deren Behandlung mit rFVIIa überwacht wurde, eine stärkere Korrelation mit der Klinik als die FACS-Methode. Diese wiederum erfasst die zellfunktionsbedingten Ursachen analytischer.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Messung und Auswertung der TGT-Parameter ETP und PEAK, in geringerem Maße LT und TTP, die prothämostatische Wirkung Zellfunktions-basierter Medikamente in plättchenreichem Plasma erfasst. Damit erlaubt sie über die Charakterisierung von Gerinnungsstörungen hinaus prädiktive Aussagen über die individuell angemessene Dosierung von rFVIIa (NovoSeven®).

Summary

Established cell-free laboratory and in-vitro diagnostic clotting assays measure the time from triggering coagulation to clot formation. However, they are not suitable for assaying the haemostatic efficacy of rFVIIa as a therapeutic agent that requires the function of blood cells and exceptionally, of platelets. Moreover, these coagulation tests measure only a limited part of the coagulation process through a time window which covers only a small part ($\leq 5\%$) of the thrombin formed, neglecting the dynamics of thrombin formation. What is more, the platelets and platelet physiology play the main role in presenting phospholipids on the platelet membrane, which is a prerequisite for an individually sufficient thrombin generation. Thus, the recording of the endogenous thrombin potential (ETP) in platelet-rich plasma (PRP), as it was used in the work presented here, overcomes these methodical disadvantages of the established laboratory tests. Using the ETP, an individual efficacy and risk prediction becomes feasible, incorporating characteristics of haemostatic relevance such as diseases, concomitant medication, sex, environmental and life-style related factors.

In this work the thrombin generation test (TGT) was established and evaluated as a method that shows inter- and intraindividual differences regarding the thrombin generation in platelet-rich plasma. Based on the presented in-vitro results with healthy persons, the efficacy of rFVIIa in patients with Glanzmann's Thrombasthenia (GT) was investigated using the TGT. The GT patients appear as normal in cell-free, plasma-based coagulation tests, due to their thrombocyte functions related bleeding tendency. The TGT results were compared to and validated against flow cytometry (FACS) tests. The evaluation comprised hetero- and homozygous patients with different underlying mutations. First, samples from a family were investigated, then from a patient in the course of a dental procedure (ex-vivo-in-vitro), where they were correlated with the clinical observations.

The TGT showed a markedly prohaemostatic efficacy of rFVIIa for all healthy persons and patients, whereas FACS measured the underlying cellular functions. Thereby, differences between healthy persons, heterozygous and homozygous patients were detected that can be utilized for diagnostic or therapeutic purposes. Different mutations and other underlying thrombocyte-related mechanisms are reflected in the

changes of the FACS parameters that correlate with the TGT values for ETP and PEAK. However, especially for patient EG who had her treatment monitored, the TGT showed a stronger correlation with the clinical observations than the FACS method. The latter is, in contrast, more analytical for determining causes related to cell functions.

The results from the work presented here show that recording and evaluating the TGT parameters ETP and PEAK, to a lesser extent LT and TTP, reflects the prohaemostatic efficacy of therapeutic agents based on cellular function. Thus, beyond the characterisation of coagulation disorders the TGT permits predictive statements concerning appropriate individual doses of rFVIIa (NovoSeven®).

Materialien

Blutentnahme:

Reagenzien:

- Blutentnahmeröhrchen: Sarstedt (10 ml, Typ 9NC, 3,13 % Citrat Endkonzentration)
- Butterfly-Punktionsnadeln: Becton-Dickinson 19 Gauge 0,8 mm Durchmesser
- Adapter: Sarstedt

Plasmapräparation:

- Zentrifuge: Heraeus Sepatech 17R
- Rotor: CR-2705

Thrombingenerierungstest (TGT):

Reagenzien und Verbrauchsmaterialien:

- Fluorogenes Substrat: Z-GGR-AMC (Bachem, Schweiz), eingestellt auf 5 mM in Puffer B
- Bovines Serumalbumin (BSA): Sigma, $\geq 98\%$ Reinheit, pH 7.0 voreingestellt
- Puffer A: HEPES 20 mM, NaCl 140 mM, pH 7.5
- Puffer B: HEPES 20 mM, BSA 6g/l, NaCl 140 mM, pH 7.5
- Calciumchloridlösung: CaCl_2 1 M, pH 7.5
- Tissue factor (TF): Innovin[®], (Dade Behring, Marburg)
- rFVIIa: (NovoSeven[®], Novo Nordisk, Dänemark)
- Mais-Trypsin-Inhibitor (CTI): 1 mg, (CTI 01; Haematologic Technologies Inc., USA)
- TF- neutralisierender Antikörper: Polyklonaler Antikörper gegen humanen Tissue Factor, American Diagnostica Inc. (USA), No. 4502, rabbit anti-human TF IgG
- Microtiterplatter 96-well: Greiner Nr. 655801 (flacher, transparenter

Boden; schwarze Wand)

- Microtiterplatte 384-well: Greiner Nr. 781096 (flacher, transparenter Boden; schwarze Wand)

Geräte:

- Fluorometer: Fluorometer ThermoLabsystems Fluoroskan FL, Seriennr. 374-1595C
- Gerätesoftware: Firmware 2.5
- Filter: ThermoLabsystems Excitationsfilter 390 nm
ThermoLabsystems Emissionsfilter 460 nm

Auswertungssoftware:

primär: Ascent 2.4.2
sekundär: Microsoft Excel Versionen 8-11

Durchflusszytometrie (FACS):

Spezielle Reagenzien:

- Fibrinogenrezeptor-Antikörper:
 - Chicken-anti-human fibrinogen-antibody, FITC-konj. Best.Nr. WAK-FA-AFFITC-2; WAK Medical GmbH, Bad Soden
 - PAC-1, FITC-konj. Maus IgM, kappa, Best.Nr. 340507, BD Bioscience
- Phospholipid- (Phosphatidylserin-) Bindeprotein:
 - Annexin V, FITC-konj., Best.Nr. 556420

- P-Selectin (CD62P) Antikörper:

Maus IgG1, kappa

- FITC-konj. : Best.Nr. 555523, BD Pharmingen™
oder
- PE-konj. : Best.Nr.: 348107, BD Bioscience

Geräte:

- BectonDickinson FACScan Durchflusszytometer
- Steuercomputer Apple G4 Desktop 450 MHz

Auswertungssoftware:

primär: BD Cellquest 3.1; Cellquest Pro 4.0.2
sekundär: Microsoft Excel 8-11

Plasmatische Teste:

Reagenzien:

- Quick-Test: Thromborel S (Dade Behring), 100 µl
+ 200 µl Citratplasma
- aPTT: Pathromtin SL (Dade Behring), 100 µl
Calciumchloridlösung 0,025 mol/L, 100 µl
+ 100 µl Citratplasma

Geräte (Analyseautomaten):

- AMAX 190
- Amelung CS 400

Auswertungssoftware:

primär: Geräteeigen
sekundär: Microsoft Excel 8-11

Alle sonstigen Reagenzien (Aqua dest., NaCl, CaCl₂, HEPES) waren kommerziell z. B. von Sigma erhältliche Standardreagenzien.

Literatur

1. Rapaport SI, Rao LVM. The tissue factor pathway: how it has become a „Prima Ballerina“. *Thromb Haemost* 74: 7-17 (1995)
2. Camerer E, Kolstø AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 81: 1-41 (1996)
4. Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry* 2002;67(1):3–12.
5. Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francio JL. The presence and release from tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002;13(4):247–53.
6. Cerchiara E, Tirindelli MC, Giannetti B, Dicuonzo G, Avvisati G. The numerous properties of the anticoagulant protein C. *Clin Ter.* 2007 Mar-Apr;158(2):181-7
7. Monroe DM, Hoffman M, Oliver JA, Roberts HR. Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor. *Br J Haematol.* 1997 Dec;99(3):542-7.
8. Hagen FS, Gray CL, O'Hara P, Grant FJ, Saari GC, Woodbury RG, Hart CE, Insley M, Kisiel W, Kurachi K, et al. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Apr;83(8):2412-6.
9. Banner DW, D'Arcy A, Chène C, Winkler FK, Guha A, Konigsberg WH, Nemerson Y, Kirchhofer D. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature.* 1996 Mar 7;380(6569):41-6.
10. Persson E, Petersen LC. Structurally and functionally distinct Ca²⁺ binding sites in the gamma-carboxyglutamic acid-containing domain of factor VIIa. *Eur J Biochem.* 1995 Nov 15;234(1):293-300.
11. Persson E, Olsen OH, Ostergaard A, Nielsen LS. Ca²⁺ binding to the first epidermal growth factor-like domain of factor VIIa increases amidolytic activity and tissue factor affinity. *J Biol Chem.* 1997 Aug 8;272(32):19919-24.
12. Wildgoose P, Foster D, Schiødt J, Wiberg FC, Birktoft JJ, Petersen LC. Identification of a calcium binding site in the protease domain of human blood coagulation factor VII: evidence for its role in factor VII-tissue factor interaction. *Biochemistry.* 1993 Jan 12;32(1):114-9.
13. Bom VJ, Bertina RM. The contributions of Ca²⁺, phospholipids and tissue-factor apoprotein to the activation of human blood-coagulation factor X by activated factor VII. *Biochem J.* 1990 Jan 15;265(2):327-36.
14. Freskgård PO, Olsen OH, Persson E. Structural changes in factor VIIa induced by Ca²⁺ and tissue factor studied using circular dichroism spectroscopy. *Protein Sci.* 1996 Aug;5(8):1531-40.
15. Persson E, Bak H, Olsen OH. Substitution of valine for leucine 305 in factor VIIa

increases the intrinsic enzymatic activity. *J Biol Chem*. 2001 Aug 3;276(31):29195-9.

16. Ruf W, Dickinson CD. Allosteric regulation of the cofactor-dependent serine protease coagulation factor VIIa. *Trends Cardiovasc Med*. 1998 Nov;8(8):350-6.

17. Thim L, Bjoern S, Christensen M, Nicolaisen EM, Lund-Hansen T, Pedersen AH, Hedner U. Amino acid sequence and posttranslational modifications of human factor VIIa from plasma and transfected baby hamster kidney cells. *Biochemistry*. 1988 Oct 4;27(20):7785-93.

18. Lund-Hansen T, Petersen LC. Comparison of enzymatic properties of human plasma FVIIa and human recombinant FVIIa. *Thromb Haemost* 1987; 58: 270

19. Persson E, Nielsen LS. Site-directed mutagenesis but not gamma-carboxylation of Glu-35 in factor VIIa affects the association with tissue factor. *FEBS Lett*. 1996 May 6;385(3):241-3.

20. Drakenberg T, Fernlund P, Roepstorff P, Stenflo J. beta-Hydroxyaspartic acid in vitamin K-dependent protein C. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1983 Apr;80(7):1802-6.

21. Kisiel W, McMullen BA. Isolation and characterization of human factor VIIa. *Thromb Res*. 1981 May 1;22(3):375-80

22. Bjoern S, Foster DC, Thim L, Wiberg FC, Christensen M, Komiyama Y, Pedersen AH, Kisiel W. Human plasma and recombinant factor VII. Characterization of O-glycosylations at serine residues 52 and 60 and effects of site-directed mutagenesis of serine 52 to alanine. *J Biol Chem*. 1991 Jun 15;266(17):11051-7

23. Kentzer EJ, Buko A, Menon G, Sarin VK. Carbohydrate composition and presence of a fucose-protein linkage in recombinant human pro-urokinase. *Biochem Biophys Res Commun*. 1990 Aug 31;171(1):401-6

24. Nishimura H, Kawabata S, Kisiel W, Hase S, Ikenaka T, Takao T, Shimonishi Y, Iwanaga S. Identification of a disaccharide (Xyl-Glc) and a trisaccharide (Xyl2-Glc) O-glycosidically linked to a serine residue in the first epidermal growth factor-like domain of human factors VII and IX and protein Z and bovine protein Z. *J Biol Chem*. 1989 Dec 5;264(34):20320-5.

25. Iino M, Foster DC, Kisiel W. Functional consequences of mutations in Ser-52 and Ser-60 in human blood coagulation factor VII. *Arch Biochem Biophys*. 1998 Apr 15;352(2):182-92

26. Klausen NK, Kornfelt T. Analysis of the glycoforms of human recombinant factor VIIa by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 1995 Dec 1;718(1):195-202.

27. *Mol Biotechnol*. 1998 Jun;9(3):195-204. Links Analysis of the site-specific asparagine-linked glycosylation of recombinant human coagulation factor VIIa by glycosidase digestions, liquid chromatography, and mass spectrometry. Klausen NK, Bayne S, Palm L.

28. Palm L, Roepstorff P, Klausen NK. Elucidation of N-linked carbohydrate structures in recombinant human factor VII by combination of MALDI-MS and glycosidase digestions. XVIII International Carbohydrate Symposium Milan, Italy 1996
29. Weber PL, Kornfelt T, Klausen NK, Lunte SM. Characterization of glycopeptides from recombinant coagulation factor VIIa by high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis using ultraviolet and pulsed electrochemical detection. *Anal Biochem.* 1995 Feb 10;225(1):135-42
30. Berkner K, Busby S, Davie E, Hart C, Insley M, Kisiel W, Kumar A, Murray M, O'Hara P, Woodbury R, et al. Isolation and expression of cDNAs encoding human factor VII. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51 Pt 1:531-41
31. Butenas S, Mann KG. Kinetics of human factor VII activation. *Biochemistry.* 1996 Feb 13;35(6):1904-10.
32. Bjoern S Thim L. Activation of coagulation factor VII to VIIa. *Res Discl* 1986; 269: 564-565
33. Wildgoose P, Berkner KL, Kisiel W. Synthesis, purification, and characterization of an Arg152-Glu site-directed mutant of recombinant human blood clotting factor VII. *Biochemistry.* 1990 Apr 3;29(13):3413-20.
33. Brinkhous KM, Hedner U, Garriss JB, Diness V, Read MS. Effect of recombinant factor VIIa on the hemostatic defect in dogs with hemophilia A, hemophilia B, and von Willebrand disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Feb;86(4):1382-6.
34. Diness V, Lund-Hansen T, Hedner U. Effect of recombinant human FVIIa on warfarin-induced bleeding in rats. *Thromb Res.* 1990 Sep 15;59(6):921-9
35. Diness V, Bregengaard C, Erhardtsen E, Hedner U. Recombinant human factor VIIa (rFVIIa) in a rabbit stasis model. *Thromb Res.* 1992 Jul 15;67(2):233-41.
36. Erhardtsen E, Nony P, Dechavanne M, Ffrench P, Boissel JP, Hedner U. The effect of recombinant factor VIIa (NovoSeven) in healthy volunteers receiving acenocoumarol to an International Normalized Ratio above 2.0. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1998 Nov;9(8):741-8.
37. Lindley CM, Sawyer WT, Macik BG, Lusher J, Harrison JF, Baird-Cox K, Birch K, Glazer S, Roberts HR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant factor VIIa. *Clin Pharmacol Ther.* 1994 Jun;55(6):638-48.
38. Hedner U, Kristensen H, Berntorp K. Pharmacokinetics of rFVIIa in children. *Haemophilia* 1998; 4:355
39. Girard P, Nony P, Erhardtsen E, Delair S, Ffrench P, Dechavanne M, Boissel JP. Population pharmacokinetics of recombinant factor VIIa in volunteers anticoagulated

with acenocoumarol. *Thromb Haemost.* 1998 Jul;80(1):109-13.

40. Erhardtsen E. Pharmacokinetics of recombinant activated factor VII (rFVIIa). *Semin Thromb Hemost.* 2000;26(4):385-91.

41. Johannessen M, Andreasen RB, Nordfang O. Decline of factor VIII and factor IX inhibitors during long-term treatment with NovoSeven. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2000 Apr;11(3):239-42.

42. Brackmann HH, Effenberger W, Hess L, Schwaab R, Oldenburg J. Immune tolerance induction: a role for recombinant activated factor VII (rFVIIa)? *Eur J Haematol Suppl.* 1998;63:18-23

43. Kobelt R. A Swiss treatment concept for the use of rFVIIa in the context of immune tolerance therapy. In: Scharrer I, von Depka M. *Recombinant Factor FVIIa Current and Future.* Frankfurt/Main Germany: Weller Verlag 2000:50-7

44. Manno CS. Treatment options for bleeding episodes in patients undergoing immune tolerance therapy. *Haemophilia.* 1999 Sep;5 Suppl 3:33-4

45. Bernstein DE, Jeffers L, Erhardtsen E, Reddy KR, Glazer S, Squiban P, Bech R, Hedner U, Schiff ER. Recombinant factor VIIa corrects prothrombin time in cirrhotic patients: a preliminary study. *Gastroenterology.* 1997 Dec;113(6):1930-7

46. Holm M, Andreasen R, Ingerslev J. Management of bleeding using recombinant factor VIIa in a patient suffering from bleeding tendency due to a lupus anticoagulant-hypoprothrombinemia syndrome. *Thromb Haemost.* 1999 Dec;82(6):1776-8

47. Muleo G, Santoro R, Iannaccaro PG, Papaleo P, Leo F, Zappala D, Elia L. Small doses of recombinant factor VIIa in acquired deficiencies of vitamin K dependent factors. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 1999 Dec;10(8):521-2

48. Kristensen J, Killander A, Hippe E, Helleberg C, Ellegard J, Holm M, Kutti J, Mellqvist UH, Johansson JE, Glazer S, Hedner U. Clinical experience with recombinant factor VIIa in patients with thrombocytopenia. *Haemostasis.* 1996;26 Suppl 1:159-64

49. Peters M, Heijboer H. Treatment of a patient with Bernard-Soulier syndrome and recurrent nosebleeds with recombinant factor VIIa. *Thromb Haemost.* 1998 Aug;80(2):352

50. Poon MC, Demers C, Jobin F, Wu JW. Recombinant factor VIIa is effective for bleeding and surgery in patients with Glanzmann thrombasthenia. *Blood.* 1999 Dec 1;94(11):3951-3.

51. Hedner U. Dosing with recombinant factor viia based on current evidence. *Semin Hematol.* 2004 Jan;41(1 Suppl 1):35-9

52. Cawthorn KM, van't Veer C, Lock JB, DiLorenzo ME, Branda RF, Mann KG. *Blood*

coagulation in hemophilia A and hemophilia B. *Blood* 1998;91(12):4581–92.

53. Kristensen J, Kilander A, Hippe E, Helleberg C, Ellegard J, Holm M, Kutti J, Mellquist UH, Johansson JE, Glazer S, Hedner U. Clinical experience with recombinant factor VIIa in patients with thrombocytopenia. *Haemostasis* 1996; 26(Suppl 1):159–64.

54. Kjalke M, Johannessen M, Hedner U. Effect of recombinant factor VIIa (NovoSeven) on thrombocytopenialike conditions in vitro. *Semin Hematol* 2001;38(Suppl 12):15–20.

55. Monroe DM, Hoffman M, Oliver JA, Roberts HR. Platelet activity of high-dose factor VIIa is independent of tissue factor. *Br J Haematol* 1997;99:542–7.

56. Monroe DM, Hoffman M, Oliver JA, Roberts HR. A possible mechanism of action of activated factor VII independent of tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998;9(Suppl 1):S15–S20.

57. Key NS, Aledort LM, Beardsley D, Cooper HA, Davignon G, Ewenstein BM, Gilchrist GS, Gill JC, Glader B, Hoots WK, Kisker CT, Lusher JM, Rosenfield CG, Shapiro AD, Smith H, Taft E. Home treatment of mild to moderate bleeding episodes using recombinant factor VIIa (Novoseven) in haemophiliacs with inhibitors. *Thromb Haemost.* 1998 Dec;80(6):912-8.

58. Shapiro AD, Gilchrist GS, Hoots WK, Cooper HA, Gastineau DA. Prospective, randomised trial of two doses of rFVIIa (NovoSeven) in haemophilia patients with inhibitors undergoing surgery. *Thromb Haemost.* 1998 Nov;80(5):773-8

59. Lusher JM, Roberts HR, Davignon G, Joist JH, Smith H, Shapiro A, Laurian Y, Kasper CK, Mannucci PM. A randomized, double-blind comparison of two dosage levels of recombinant factor VIIa in the treatment of joint, muscle and mucocutaneous haemorrhages in persons with haemophilia A and B, with and without inhibitors. *rFVIIa Study Group. Haemophilia.* 1998 Nov;4(6):790-8.

60. Ingerslev J, Freidman D, Gastineau D, Gilchrist G, Johnsson H, Lucas G, McPherson J, Preston E, Scheibel E, Shuman M. Major surgery in haemophilic patients with inhibitors using recombinant factor VIIa. *Haemostasis.* 1996;26 Suppl 1:118-23

61. Hay CR, Negrier C, Ludlam CA .The treatment of bleeding in acquired haemophilia with recombinant factor VIIa: a multicentre study. *Thromb Haemost.* 1997 Dec;78(6):1463-7

62. Liebman HA, Chediak J, Fink KI, Galvez AG, Shah PC, Sham RL. Activated recombinant human coagulation factor VII (rFVIIa) therapy for abdominal bleeding in patients with inhibitory antibodies to factor VIII. *Am J Hematol.* 2000 Mar;63(3):109-13

63. Arkin S, Cooper HA, Hutter JJ, Miller S, Schmidt ML, Seibel NL, Shapiro A, Warrier

- I. Activated recombinant human coagulation factor VII therapy for intracranial hemorrhage in patients with hemophilia A or B with inhibitors. Results of the novoseven emergency-use program. *Haemostasis*. 1998 Mar-Apr;28(2):93-8
64. Fachinformation Novo Nordisk, 7799-W676 NovoSeven, Januar 2004
65. Mayer SA, Brun NC, Begtrup K, Broderick J, Davis S, Diringer MN, Skolnick BE, Steiner T. Recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med*. 2005 Feb 24;352(8):777-85
66. Hemker HC, Wielders S, Kessels H, Beguin S. Continuous registration of thrombin generation in plasma, its use for the determination of the thrombin potential. *Thromb Haemost* 70: 617-24 (1993)
67. Dager WE, King JH, Regalia RC, Williamson D, Gosselin RC, White RH, Tharratt RS, Albertson TE. Reversal of elevated international normalized ratios and bleeding with low-dose recombinant activated factor VII in patients receiving warfarin. *Pharmacotherapy*. 2006 Aug;26(8):1091-8.
68. McMullin NR, Kauvar DS, Currier HM, Baskin TW, Pusateri AE, Holcomb JB. The clinical and laboratory response to recombinant factor VIIA in trauma and surgical patients with acquired coagulopathy. *Curr Surg*. 2006 Jul-Aug;63(4):246-51.
69. Abshire T, Kenet G. Recombinant factor VIIa: review of efficacy, dosing regimens and safety in patients with congenital and acquired factor VIII or IX inhibitors. *J Thromb Haemost*. 2004 Jun;2(6):899-909.
70. Prasa D, Svendsen L, Stürzebecher J. Inhibition of thrombin generation in plasma by inhibitors of factor Xa. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1215-20
71. Brunsting A. Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophys J*. 1974 Jun;14(6):439-53.
72. Brunsting A. Can light-scattering techniques be applied to flow-through cell analysis? *J Histochem Cytochem*. 1974 Jul;22(7):607-15.
73. Ibrahim SF, van den Engh G. Flow cytometry and cell sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2007;106:19-39.
74. McCarthy RC, Fetterhoff TJ. Issues for quality assurance in clinical flow cytometry. *Arch Pathol Lab Med*. 1989 Jun;113(6):658-66.
75. Hemker, H.C. and Beguin, S. Thrombin generation in plasma: its assessment via the endogenous thrombin potential. *Thromb Haemost* 1995; 74: 134-8
76. Ruf A, Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21(2):146-51.

77. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*. 1987 Jul;70(1):307-15.
78. Neumann FJ, Zohlnhöfer D, Fakhoury L, Ott I, Gawaz M, Schömig A. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1999 Nov 1;34(5):1420-6. Links
79. Hagberg IA, Lyberg T. Evaluation of circulating platelet-leukocyte conjugates: a sensitive flow cytometric assay well suited for clinical studies. *Platelets*. 2000 May;11(3):151-60.
80. Ingerslev J. Efficacy and safety of recombinant factor VIIa in the prophylaxis of bleeding in various surgical procedures in hemophilic patients with factor VIII and factor IX inhibitors. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26(4):425-32.
81. Ingerslev J, Sneppen O, Hvid I, Fredberg U, Kristensen HL, Sindet-Petersen S. Treatment of acute bleeding episodes with rFVIIa. *Vox Sang*. 1999;77 Suppl 1:42-6
82. O'Connell KA, Wood JJ, Wise RP, Lozier JN, Braun MM. Thromboembolic adverse events after use of recombinant human coagulation factor VIIa. *JAMA*. 2006 Jan 18;295(3):293-8
84. Lak M, Scharling B, Blemings A, Sharifian R, Maleki Z, Daraee A, Arjmand AR, Hedner U. Evaluation of rFVIIa (NovoSeven) in Glanzmann patients with thromboelastogram. *Haemophilia*. 2008 Jan;14(1):103-10
85. Herstellerinfo "polyclonal antibodies against human tissue factor, product No. 4501, No. 4502" American Diagnostica, ADI000331.rev2.020228 und ADI931210, American Diagnostica Stand: 10.01.2008
86. Trowbridge CC, Stammers AH, Ciccarelli N, Klayman M. Dose titration of recombinant factor VIIa using thromboelastograph monitoring in a child with hemophilia and high titer inhibitors to factor VIII: a case report and brief review. *J Extra Corpor Technol*. 2006 Sep;38(3):254-9
87. Mathew P. Current opinion on inhibitor treatment options. *Semin Hematol*. 2006 Apr;43(2 Suppl 4):S8-13
88. Young G. New approaches in the management of inhibitor patients. *Acta Haematol*. 2006;115(3-4):172-9
89. Dargaud Y, Negrier C. Haemophilia therapies. *Expert Opin Biol Ther*. 2007 May;7(5):651-63
90. Mariani G, Konkle BA, Ingerslev J. Congenital factor VII deficiency: therapy with recombinant activated factor VII -- a critical appraisal. *Haemophilia* 2006 Jan;12(1):19-27

91. Mullighan CG, Rischbieth A, Duncan EM, Lloyd JV. Acquired isolated factor VII deficiency associated with severe bleeding and successful treatment with recombinant FVIIa (NovoSeven). *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004 Jun;15(4):347-51
92. Delgado J, Jimenez-Yuste V, Hernandez-Navarro F, Villar A. Acquired haemophilia: review and meta-analysis focused on therapy and prognostic factors. *Br J Haematol*. 2003 Apr;121(1):21-35
93. Heuer L, Blumenberg D. Accidental overdosage of recombinant factor VIIa due to mistaken package size. *Thromb Haemost*. 2004 Jun;91(6):1249-50
94. Warren O, Mandal K, Hadjianastassiou V, Knowlton L, Panesar S, John K, Darzi A, Athanasiou T. Recombinant activated factor VII in cardiac surgery: a systematic review. *Ann Thorac Surg*. 2007 Feb;83(2):707-14.
95. Erhardtsen E. To general haemostasis--the evidence-based route. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002;32 Suppl 1:47-52
96. Parameswaran R, Shapiro AD, Gill JC, Kessler CM. Dose effect and efficacy of rFVIIa in the treatment of haemophilia patients with inhibitors: analysis from the Hemophilia and Thrombosis Research Society Registry. *Haemophilia*. 2005 Mar;11(2):100-6.
97. Sachs B, Delacy D, Green J, Graham RS, Ramsay J, Kreisler N, Kruse P, Khutoryansky N, Hu SS. Recombinant activated factor VII in spinal surgery: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Spine*. 2007 Oct 1;32(21):2285-93
98. Steiner T, Jüttler E, Ringleb P. Acute stroke therapy - Current developments. *Nervenarzt*. 2007 Oct;78(10):1147-54.
99. Mohr AM, Holcomb JB, Dutton RP, Duranteau J. Recombinant activated factor VIIa and hemostasis in critical care: a focus on trauma. *Crit Care*. 2005;9 Suppl 5:S37-
100. Zotz RB, Scharf RE. Recombinant factor VIIa in patients with platelet function disorders or thrombocytopenia. *Hämostaseologie* 2007 Sep;27(4):251-62
101. Roberts HR, Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of thrombin generation. *Semin Thromb Hemost*. 2006 Apr;32 Suppl 1:32-8.
102. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. *Blood Rev*. 2003 Sep;17 Suppl 1:S1-5.
103. Hemker HC, Giesen PL, Ramjee M, Wagenvoort R, Béguin S. The thrombogram:

- monitoring thrombin generation in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost.* 2000 Apr;83(4):589-91.
104. Luddington R, Baglin T. Clinical measurement of thrombin generation by calibrated automated thrombography requires contact factor inhibition. *J Thromb Haemost.* 2004 Nov;2(11):1954-9.
105. Haematologic Technologies, Inc. 57 River Road Essex Junction, VT USA
CTI-01 Corn Trypsin Inhibitor Datenblatt 2004
106. Rauch U, Nemerson Y. Circulating tissue factor and thrombosis. *Curr Opin Hematol.* 2000 Sep;7(5):273-7.
107. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):2311-5.
108. Kristensen J, Kilander A, Hippe E, Helleberg C, Ellegard J, Holm M, Kutti J, Mellquist UH, Johansson JE, Glazer S, Hedner U. Clinical experience with recombinant factor VIIa in patients with thrombocytopenia. *Haemostasis* 1996; 26(Suppl 1):159–64
109. Butenas S, Cawthorn KM, van't Veer C, DiLorenzo ME, Lock JB, Mann KG. Antiplatelet agents in tissue-factor induced blood coagulation. *Blood* 2001;97: 2314–22.
100. Kjalke M, Johannessen M, Hedner U. Effect of recombinant factor VIIa (NovoSeven) on thrombocytopenialike conditions in vitro. *Semin Hematol* 2001;38(Suppl 12): 15–20.
111. Siegemund T, Petros S, Siegemund A, Scholz U, Engelmann L. Thrombin generation in severe haemophilia A and B: the endogenous thrombin potential in platelet-rich plasma. *Thromb Haemost.* 2003 Nov;90(5):781-6.
112. Chantarangkul V, Clerici M, Bressi C, Giesen PLA, Tripodi A (2003), Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypocoagulability. *Haematologica* 88:547-554
113. Hemker HC, Dieri R Al, Béguin S (2004), Thrombin generation assays: accruing clinical relevance. *Curr Opin Hematol* 11:170-175
114. Vanschoonbeek K, Feijge MAH, Kampen RJW van, Kenis H, Hemker HC, Giesen PLA, Heemskerk JWM, Initiating and potentiating the role of platelets in tissue factor induced thrombin generation in the presence of plasma: subject dependent variation in thrombogram characteristics. *J Thromb Haemost* 2004 Mar;2(3):476-84
115. Brummel-Ziedins KE, Pouliot RL, Mann KG (2004), Thrombin generation: phenotypic quantitation. *J Thromb Haemost* 2:281-8

116. Roberts HR, Monroe DM, Oliver JA, Chang JY, Hoffman M. Newer concepts of blood coagulation. *Haemophilia*. 1998 Jul;4(4):331-4.
117. Lisman T, De Groot PHG. Mechanism of action of recombinant factor VIIa. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1138–9
118. Hoffman M, Monroe DM. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost* 2001;85:958–65
119. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roqué M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 2;96(5):2311-5
120. Smith SA, Comp PC, Morrissey JH. Traces of factor VIIa modulate thromboplastin sensitivity to factors V, VII, X, and prothrombin. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1553–8
121. Cid AR, Lorenzo JJ, Haya S, Montoro JM, Casana P, Aznar JA. A comparison of FVII:C and FVIIa assays for the monitoring of recombinant factor VIIa treatment. *Hemophilia* 2001;7:39–41.
122. Monroe DM, Hoffman M, Roberts HR (2002), Platelets and Thrombin Generation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 22:1381-1389
123. Allen GA, Wolberg AS, Oliver JA, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Impact of procoagulant concentration on rate, peak and total thrombin generation in a model system. *J Thromb Haemost*. 2004 Mar;2(3):402-13.
124. Hedner U. Dosing and monitoring NovoSeven treatment. *Haemostasis* 1996;26(Suppl 1):102–8.
125. Wegert W, Harder S, Bassus S, Kirchmaier CM. Platelet-dependent thrombin generation assay for monitoring the efficacy of recombinant Factor VIIa. *Platelets*. 2005 Feb;16(1):45-50.
126. Kenet G. High-dose recombinant factor VIIa therapy in hemophilia patients with inhibitors. *Semin Hematol*. 2006 Jan;43(1 Suppl 1):S108-10.
127. Abshire TC. Dose optimization of recombinant factor VIIa for control of mild to moderate bleeds in inhibitor patients: Improved efficacy with higher dosing. *Semin Hematol*. 2004 Jan;41(1 Suppl 1):3-7
128. Poon MC. The evidence for the use of recombinant human activated factor VII in the treatment of bleeding patients with quantitative and qualitative platelet disorders. *Transfus Med Rev*. 2007 Jul;21(3):223-36
129. Laffan M, O'Connell NM, Perry DJ, Hodgson AJ, O'Shaughnessy D, Smith OP. Analysis and results of the recombinant factor VIIa extended-use registry. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003 Jun;14 Suppl 1:S35-8

130. Seremetis S. Dose optimization of recombinant factor VIIa in the treatment of acute bleeding in haemophilia-associated inhibitors. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003 Jun;14 Suppl 1:S29-30
131. Hemker HC, Al Dieri R, De Smedt E, Béguin S. Thrombin generation, a function test of the haemostatic-thrombotic system. *Thromb Haemost*. 2006 Nov;96(5):553-61
132. Kenneth G. Mann, Kathleen Brummel-Ziedins, Thomas Orfeo, Saulius Butenas. Models of blood coagulation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 36 (2006) 108–117
133. Koestenberger M, Cvirn G, Nagel B, Rosenkranz A, Leschnik B, Gamillscheg A, Beitzke A, Muntean W. Thrombin generation determined by calibrated automated thrombography (CAT) in pediatric patients with congenital heart disease. *Thromb Res*. 2007 Oct 2
134. Dielis AW, Castoldi E, Spronk HM, van Oerle R, Hamulyák K, Ten Cate H, Rosing J. Coagulation factors and the protein C system as determinants of thrombin generation in a normal population. *J Thromb Haemost*. 2007 Nov 6
135. Regnault V, Hemker HC, Wahl D, Lecompte T. Phenotyping the haemostatic system by thrombography--potential for the estimation of thrombotic risk. *Thromb Res*. 2004;114(5-6):539-45
136. Hemker HC, Giesen P, Al Dieri R, Regnault V, de Smedt E, Wagenvoort R, Lecompte T, Béguin S. Calibrated automated thrombin generation measurement in clotting plasma. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2003;33(1):4-15
137. Gando S, Nanzaki S, Morimoto Y, Kobayashi S, Kemmotsu O. Systemic activation of tissue-factor dependent coagulation pathway in evolving acute respiratory distress syndrome in patients with trauma and sepsis. *J Trauma*. 1999 Oct;47(4):719-23.
138. Gando S, Nanzaki S, Morimoto Y, Ishitani T, Kemmotsu O. Tissue factor pathway inhibitor response does not correlate with tissue factor-induced disseminated intravascular coagulation and multiple organ dysfunction syndrome in trauma patients. *Crit Care Med*. 2001 Feb;29(2):262-6.
139. Molnar S, Guglielmone H, Lavarda M, Rizzi ML, Jarchum G. Procoagulant factors in patients with cancer. *Hematology*. 2007; 12(6):555-559
140. Gando S, Nanzaki S, DSasaki S, Kemmotsu O. Significant correlations between tissue factor and thrombin markers in trauma and septic patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost*. 1998 Jun;79(6):1111-5.
141. Penner JA. Disseminated intravascular coagulation in patients with multiple organ failure of non-septic origin. *Semin Thromb Hemost*. 1998;24(1):45-52. Review.

142. Gando S, Kameue T, Matsuda N, Hayakawa M, Morimoto Y, Ishitani T, Kemmotsu O. Imbalances between the levels of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in ARDS patients. *Thromb Res.* 2003 Jan 25;109(2-3):119-24.
143. Hobbs SD, Haggart P, Fegan C, Bradbury AW, Adam DJ. The role of tissue factor in patients undergoing open repair of ruptured and nonruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2007 Oct;46(4):682-6.
145. Lisman T, Adelmeijer J, Cauwenberghs S, van Pampus ECM, Heemskerk JWM, de Groot PG. Recombinant factor VIIa enhances platelet adhesion and activation under flow conditions at normal and reduced platelet count. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 742–51
146. Hedner U. General Haemostatic Agents – Fact or Fiction? *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002;32(suppl 1):33–36
147. Sörensen B, Ingerslev J. Tailoring haemostatic treatment to patient requirements – an update on monitoring haemostatic response using thrombelastography. *Haemophilia* (2005), 11, (Suppl. 1), 1–6
148. Hoffman M. Remodeling the Blood Coagulation Cascade. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* 16(1/2), 17–20, 2003
149. Förster Y, Meye A, Albrecht S, Schwenzer B. Tissue factor and tumor: clinical and laboratory aspects. *Clin Chim Acta.* 2006 Feb;364(1-2):12-21
150. Gerotziafas GT, Chakroun T, Depasse F, Arzoglou P, Samama MM, Elalamy I. The role of platelets and recombinant factor VIIa on thrombin generation, platelet activation and clot formation. *Thromb Haemost.* 2004 May;91(5):977-85.
151. Gerotziafas GT, Depasse F, Busson J, Leflem L, Elalamy I, Samama MM. Towards a standardization of thrombin generation assessment: the influence of tissue factor, platelets and phospholipids concentration on the normal values of Thrombogram-Thrombinoscope assay. *Thromb J.* 2005 Oct 26;3:16
152. Dargaud Y, Luddington R, Baglin TP. Elimination of contact factor activation improves measurement of platelet-dependent thrombin generation by calibrated automated thrombography at low-concentration tissue factor. *J Thromb Haemost.* 2006 May;4(5):1160-1
153. Berettini M, Mariani G, Schiavoni M, Rocino A, Di Paolantonio T, Longo G, Morfini M. Pharmacokinetic evaluation of recombinant, activated factor VII in patients with inherited factor VII deficiency. *Haematologica.* 2001 Jun;86(6):640-5
154. Hedner U, Ezban M. Tissue Factor and Factor VIIa as Therapeutic Targets in Disorders of Hemostasis. *Annu Rev Med.* 2007 Sep 10
155. Rao LV, Pendurthi UR. Tissue factor-factor VIIa signaling. *Arterioscler Thromb*

Vasc Biol. 2005 Jan;25(1):47-56

156. Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Mar 22;1636(2-3):119-28

157. H. Coenraad Hemker, Raed Al Dieri and Suzette Béguin. Thrombin generation assays: accruing clinical relevance. *Curr Opin Hematol* 11:170–175.

158. He S, Ekman GJ, Hedner U. The effect of platelets on fibrin gel structure formed in the presence of recombinant factor VIIa in hemophilia plasma and in plasma from a patient with Glanzmann thrombasthenia. *J Thromb Haemost*. 2005 Feb;3(2):272-9.

159. Use of recombinant factor VIIa (NovoSeven) in patients with Glanzmann thrombasthenia. Poon MC, d'Oiron R, Hann I, Négrier C, de Lumley L, Thomas A, Karafoulidou A, Demers C, Street A, Huth-Kühne A, Petrini P, Fressinaud E, Morfini M, Tengborn L, Marquès-Verdier A, Musso R, Devocioglu O, Houston DS, Lethagen S, Van Geet C, von Depka M, Berger C, Beurrier P, Britton HA, Gerrits W, Guthner C, Kuhle S, Lorenzo JJ, Makris PE, Nohe N, Paugy P, Pautard B, Torchet MF, Trillot N, Vicariot M, Wilde J, Winter M, Chambost H, Ingerslev J, Peters M, Strauss G. *Semin Hematol*. 2001 Oct;38(4 Suppl 12):21-5

160. Nurden AT. Glanzmann thrombasthenia. *Orphanet J Rare Dis*. 2006 Apr 6;1:10

161. Reverter JC, Béguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker HC, Collier BS. Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. Potential implications for the effect of c7E3 Fab treatment on acute thrombosis and "clinical restenosis". *J Clin Invest*. 1996 Aug 1;98(3):863-74.

162. Dargaud Y, Bordet JC, Trzeciak MC, Vinciguerra C, Négrier C. A case of Glanzmann's thrombasthenia successfully treated with recombinant factor viia during a surgical procedure: observations on the monitoring and the mechanism of action of this drug. *Haematologica*. 2006 Jun;91(6 Suppl):ECR20.

163. Wegert W, Graff J, Kaiser D, Breddin HK, Klinkhardt U, Harder S. Effects of antiplatelet agents on platelet-induced thrombin generation. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 2002 Apr;40(4):135-41

164. Allen GA, Hoffman M, Roberts HR, Monroe DM. Manipulation of prothrombin concentration improves response to high-dose factor VIIa in a cell-based model of haemophilia. *Br J Haematol*. 2006 Aug;134(3):314-9

165. Lisman T, Adelmeijer J, Heijnen HF, de Groot PG. Recombinant factor VIIa restores aggregation of alphaIIb beta3-deficient platelets via tissue factor-independent fibrin generation. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1720-7.

166. Lisman T, Moschatsis S, Adelmeijer J, Nieuwenhuis HK, De Groot PG. Recombinant factor VIIa enhances deposition of platelets with congenital or acquired alpha IIb beta 3 deficiency to endothelial cell matrix and collagen under conditions of

flow via tissue factor-independent thrombin generation. *Blood*. 2003 Mar 1;101(5):1864-70

167. Nurden AT. Qualitative disorders of platelets and megakaryocytes. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug;3(8):1773-82

168. Dicker IB, Pedicord DL, Seiffert DA, Jamieson GA, Greco NJ. Both the high affinity thrombin receptor (GPIb-IX-V) and GPIIb/IIIa are implicated in expression of thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Thromb Haemost*. 2001 Oct;86(4):1065-9

169. Monroe DM, Hoffman M, Allen GA, Roberts HR. The factor VII-platelet interplay: effectiveness of recombinant factor VIIa in the treatment of bleeding in severe thrombocytopathia. *Semin Thromb Hemost*. 2000;26(4):373-7

170. Bonnefoy A, Liu Q, Jerome WG, Legrand C, Frojmovic MM. Platelets in suspension require preactivation to adhere to immobilized fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:459-63.

171. Aursnes I. Preactivation and deactivation of blood platelets. *Thromb Haemost*. 1982 Feb 26;47(1):3-4.

172. Seitz R, Leising H, Liebermann A, Rohner I, Gerdes H, Egbring R. Possible interaction of platelets and adrenaline in the early phase of myocardial infarction. *Res Exp Med (Berl)*. 1987;187(5):385-9

173. Linden MD, Frelinger AL 3rd, Barnard MR, Przyklenk K, Furman MI, Michelson AD. Application of flow cytometry to platelet disorders. *Semin Thromb Hemost*. 2004 Oct;30(5):501-11.

174. Hickerson DH, Bode AP. Flow cytometry of platelets for clinical analysis. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2002 Apr;16(2):421-54.

175. Budde U. Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie. *J Lab Clin Med* 2002; 26(11/12): 564-571

176. Bevers EM, Comfurius P, Zwaal RF. Regulatory mechanisms in maintenance and modulation of transmembrane lipid asymmetry: pathophysiological implications. *Lupus*. 1996 Oct;5(5):480-7.

178. Klitgaard T, Nielsen TG. Overview of the human pharmacokinetics of recombinant activated factor VII. *Br J Clin Pharmacol*. 2008 Jan;65(1):3-11

179. Jayo A, Pabón D, Lastres P, Jiménez-Yuste V, González-Manchón C. Type II Glanzmann thrombasthenia in a compound heterozygote for the alpha IIb gene. A novel missense mutation in exon 27. *Haematologica*. 2006 Oct;91(10):1352-9.

180. Jin J, Quinton TM, Zhang J, Rittenhouse SE, Kunapuli SP. Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A(2) generation in human platelets

requires coordinated signaling through integrin $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ and ADP receptors. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):193-8.

181. Contreres JO, Dupuy E, Job B, Habib A, Bryckaert M, Rosa JP, Simoneau G, Herbert JM, Savi P, Levy-Toledano S. Effect of clopidogrel administration to healthy volunteers on platelet phosphorylation events triggered by ADP. *Br J Haematol*. 2003 Feb;120(4):633-42

182. Tomiyama Y, Shiraga M, Kinoshita S, Ambo H, Kurata Y, Matsuzawa Y, Kunicki TJ. A Glanzmann thrombasthenia-like phenotype caused by a defect in inside-out signaling through the integrin $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$. *Thromb Haemost*. 1998 Nov;80(5):735-42.

183. Phillips DR, Nannizzi-Alaimo L, Prasad KS. $\beta(3)$ tyrosine phosphorylation in $\alpha(\text{IIb})\beta(3)$ (platelet membrane GP IIb-IIIa) outside-in integrin signaling. *Thromb Haemost*. 2001 Jul;86(1):246-58

184. Reséndiz JC, Kroll MH, Lassila R. Protease-activated receptor-induced Akt activation--regulation and possible function. *J Thromb Haemost*. 2007 Dec;5(12):2484-93

185. Ramars AS, Mukhopadhyay S, Dash D. Regulation of postaggregation events induced by protease-activated receptor 1 ligation in human platelets: evidence of differential signaling pathways. *Arch Biochem Biophys*. 2002 Feb 15;398(2):253-60

186. Kim S, Foster C, Lecchi A, Quinton TM, Prosser DM, Jin J, Cattaneo M, Kunapuli SP. Protease-activated receptors 1 and 4 do not stimulate $G(i)$ signaling pathways in the absence of secreted ADP and cause human platelet aggregation independently of $G(i)$ signaling. *Blood*. 2002 May 15;99(10):3629-36

187. Ramasamy I. Inherited bleeding disorders: disorders of platelet adhesion and aggregation. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 49 (2004) 1–35

188. Graff J, Klinkhardt U, Schini-Kerth VB, Harder S, Franz N, Bassus S, Kirchmaier CM. Close relationship between the platelet activation marker CD62 and the granular release of platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Mar;300(3):952-7

189. Harrison P, Cramer EM. Platelet α -granules. *Blood Rev*. 1993 Mar;7(1):52-62.

190. Procoagulant potential of platelet α granules. Polasek J. *Platelets*. 2004 Nov;15(7):403-7.

191. Freson K, Labarque V, Thys C, Wittevrongel C, Geet CV. What's new in using platelet research? To unravel thrombopathies and other human disorders. *Eur J Pediatr*. 2007 Dec;166(12):1203-10

192. Leung R, Gwozdz AM, Wang H, Bang KW, Packham MA, Freedman J, Rand ML.

Persistence of procoagulant surface expression on activated human platelets: involvement of apoptosis and aminophospholipid translocase activity. *J Thromb Haemost.* 2007 Mar;5(3):560-70

193. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol.* 1999 Sep;6(5):342-8

194. Wu CC, Teng CM. Comparison of the effects of PAR1 antagonists, PAR4 antagonists, and their combinations on thrombin-induced human platelet activation. *Eur J Pharmacol.* 2006 Sep 28;546(1-3):142-7

195. Storey RF, Sanderson HM, White AE, May JA, Cameron KE, Heptinstall S. The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *Br J Haematol.* 2000 Sep;110(4):925-3

196. Bassler N, Loeffler C, Mangin P, Yuan Y, Schwarz M, Hagemeyer CE, Eisenhardt SU, Ahrens I, Bode C, Jackson SP, Peter K. A mechanistic model for paradoxical platelet activation by ligand-mimetic alphaIIb beta3 (GPIIb/IIIa) antagonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Mar;27(3):e9-15

197. Liu J, Jackson CW, Gruppo RA, Jennings LK, Gartner TK. The beta3 subunit of the integrin alphaIIbbeta3 regulates alphaIIb-mediated outside-in signaling. *Blood.* 2005 Jun 1;105(11):4345-52

198. Fridberg MJ, Hedner U, Roberts HR, Erhardtsen E. A study of the pharmacokinetics and safety of recombinant activated factor VII in healthy Caucasian and Japanese subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2005 Jun;16(4):259-66.

199. Villar A, Aronis S, Morfini M, Santagostino E, Auerswald G, Thomsen HF, Erhardtsen E, Giangrande PL. Pharmacokinetics of activated recombinant coagulation factor VII (NovoSeven) in children vs. adults with haemophilia A. *Haemophilia.* 2004 Jul;10(4):352-9

200. Allen G, Aledort L. Therapeutic decision-making in inhibitor patients. *Am J Hematol.* 2006 Jan;81(1):71-2

101. Poon MC, D'Oiron R, Von Depka M, Khair K, Négrier C, Karafoulidou A, Huth-Kuehne A, Morfini M; International Data Collection on Recombinant Factor VIIa and Congenital Platelet Disorders Study Group. Prophylactic and therapeutic recombinant factor VIIa administration to patients with Glanzmann's thrombasthenia: results of an international survey. *J Thromb Haemost.* 2004 Jul;2(7):1096-10

202. Chuansumrit A, Sangkapreecha C, Hathirat P. Successful Epistaxis Control in a Patient with Glanzmann by Increased Bolus Injection Dose of Recombinant Factor VIIa. *Haemost* 1999; 82: 1778

203. Novo Nordisk Gesamt-Preisliste Oktober 2007.

204. Dubois C, Steiner B, Meyer Reigner SC. Contribution of PAR-1, PAR-4 and

- GPIIb/IIIa in intracellular signaling leading to the cleavage of the β 3 cytoplasmic domain during thrombin-induced platelet aggregation. *Thromb Haemost.* 2004 Apr;91(4):733-42
205. Vrethlenbrant K, Ramström S, Bjerke M, Lindahl TL. Platelet activation via PAR4 is involved in the initiation of thrombin generation and in clot elasticity development. *Thromb Haemost.* 2007 Mar;97(3):417-24
206. Chuansumrit A, Suwannuraks M, Sri-Udomporn N, Pongtanakul B, Worapongpaiboon S. Recombinant activated factor VII combined with local measures in preventing bleeding from invasive dental procedures in patients with Glanzmann thrombasthenia. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2003 Feb;14(2):187-90
207. Poon MC, Demers C, Jobin F, Wu JW. Recombinant factor VIIa is effective for bleeding and surgery in patients with Glanzmann thrombasthenia. *Blood.* 1999 Dec 1;94(11):3951-3.
208. Poon MC. Use of recombinant factor VIIa in hereditary bleeding disorders. *Curr Opin Hematol.* 2001 Sep;8(5):312-8.
209. Gobbi G, Sponzilli I, Mirandola P, Tazzari PL, Caimi L, Cacchioli A, Matteucci A, Giuliani Piccari G, Cocco L, Vitale M. Efficient platelet delta-granule release induced by $[Ca^{2+}]$ elevation is modulated by GPIIb/IIIa. *Int J Mol Med.* 2006 Aug;18(2):309-1
210. Graff J, Klinkhardt U, Harder S. Pharmacodynamic profile of antiplatelet agents: marked differences between single versus costimulation with platelet activators. *Thromb Res.* 2004;113(5):295-302
211. Holinstat M, Voss B, Bilodeau ML, Hamm HE. Protease-activated receptors differentially regulate human platelet activation through a phosphatidic acid-dependent pathway. *Mol Pharmacol.* 2007 Mar;71(3):686-94
212. Ameri A, Stolte S. Correlation of activated clotting time (ACT) with rFVLLa infusion and clinical efficacy in a patient with Glanzmann thrombasthenia and platelet alloantibodies. *Thromb Haemost.* 2002 Jun;87(6):1084
213. Bourdon DM, Mahanty SK, Jacobson KA, Boyer JL, Harden TK. (N)-methanocarpa-2MeSADP (MRS2365) is a subtype-specific agonist that induces rapid desensitization of the P2Y1 receptor of human platelets. *J Thromb Haemost.* 2006 Apr;4(4):861-8
214. Mani H, Kirchmayr K, Kläffling C, Schindewolf M, Luxembourg B, Linnemann B, Lindhoff-Last E. Influence of blood collection techniques on platelet function. *Platelets.* 2004 Aug;15(5):315-8
215. Ofosu FA. Protease activated receptors 1 and 4 govern the responses of human platelets to thrombin. *Transfus Apher Sci.* 2003 Jun;28(3):265-8.
217. Poon MC, Zotz R, Di Minno G, Abrams ZS, Knudsen JB, Laurian Y. Glanzmann's

thrombasthenia treatment: a prospective observational registry on the use of recombinant human activated factor VII and other hemostatic agents. *Semin Hematol.* 2006 Jan;43(1 Suppl 1):S33-6

218. Almeida AM, Khair K, Hann I, Liesner R. The use of recombinant factor VIIa in children with inherited platelet function disorders. *Br J Haematol.* 2003 May;121(3):477-81.

219. Lombardo VT, Sottolotta G. Recombinant activated factor VII combined with desmopressin in preventing bleeding from dental extraction in a patient with Glanzmann's thrombasthenia. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006 Jan;12(1):115-6.

Mein Dank gilt:

Herrn PD Dr. Carl M. Kirchmaier für die Auswahl und Vergabe des Themas sowie die kompetente fachliche und freundliche, persönliche Betreuung.

Außerdem Herrn Dr. Dr. Steffen Bassus für seine unermesslich wertvolle strukturelle Hilfe und seine reichhaltigen, gerade auch kritischen, Anregungen.

Weiterhin Dr. Dagmar Westrup, Thomas Scholz, Daniele Pillitteri und Dr. Rene Mahnel für die mir zuteilgewordene kompetente Expertise aus ihren Arbeitsgebieten sowie Christiane Herz und Carolin Schönhofen für ihren Einsatz und die direkte, praktisch-logistische Hilfe.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, für ihr unerschütterliches Vertrauen während dieser Arbeit.

An dieser Stelle ebenfalls nicht vergessen möchte ich die moralische Unterstützung und treueste Begleitung durch Brisbee, die nicht mehr unter uns ist, Zorro, und Dschinni; und ich danke nicht zuletzt dem OFC für die immerwährende Aufforderung, sich auch auf unabsehbar langen Wegen niemals entmutigen zu lassen.

Widmen möchte ich diese Arbeit Viktor Missetich.

*„Life is like a tall ship
Drifting gently from the shore
Time is like a fair wind
With a lifetime to explore
The beauty that surrounds you
Was meant to be adored
The problems that surround you
Were meant to be ignored
We are love, we are, we are love
...”*

[John Lees, BJH, 1981]

Wolfgang Wegert, * 3. August 1968 in Frankfurt am Main;
wohnhaft in D-63500 Seligenstadt; Max-Planck-Straße 46

SCHULABSCHLUSS

1987 Abitur, Rudolf-Koch-Gymnasium, Offenbach

STUDIUM

1988-1990

Studium der Biologie an der JWG-Universität Frankfurt am Main

1990-1995

Studium der Biochemie an der JWG-Universität Frankfurt am Main

1992-1999

Studium der Humanmedizin an der JWG-Universität Frankfurt am Main

- *1994* Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
- *1996* Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- *1998* Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- *1998-1999* Praktisches Jahr in den Städtischen Kliniken Offenbach am Main, Wahlfach Neurochirurgie

Praktika und Famulaturen:

- *1993* Krankenpflegepraktikum im Kreiskrankenhaus des Kreises Offenbach in Seligenstadt
- *1996* Famulatur in der Nuklearmedizin, Zentrum der Radiologie des Klinikums der JWG-Universität Frankfurt am Main
- *1996* Famulatur im Neurologischen Institut (Edinger-Institut) des Klinikums der JWG-Universität Frankfurt am Main
- *1997* Famulatur in der Allgemeinmedizin-Praxis Dr. med. Peter Klinger, Offenbach am Main

QUALIFIKATIONEN UND ABSCHLÜSSE

November 1990

Vordiplom Biologie, JWG-Universität Frankfurt am Main

September 1995

Diplom Biochemie, JWG-Universität Frankfurt am Main

Oktober 1999

Drittes Staatsexamen Humanmedizin, JWG-Universität
Frankfurt am Main

Juli 2001 Approbation als Arzt, Hessisches Landesprüfungsamt für
Heilberufe

BERUFLICHE STATIONEN

Januar 2000-Januar 2001

Arzt im Praktikum/Wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Universitätsklinikum Frankfurt am Main,
Institut für Klinische Pharmakologie:

- Mitwirkung bei der Planung, Ausführung und Evaluation klinischer Studien
- Neuentwicklung eines fluorometrischen in-vitro Gerinnungstestes (Thrombingenerierungstest)

Januar 2001-Juli 2001

Arzt im Praktikum/Wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Deutsche Klinik für Diagnostik Wiesbaden,
Hämostaseologie und Angiologie:

- Modifikation des obengenannten in-vitro Gerinnungstestes zur Wirksamkeitsüberwachung von Medikamenten

Juli 2001-Juli 2002

Wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Universitätsklinikum Frankfurt am Main,
Institut für Klinische Pharmakologie:

- Mitwirkung bei der Planung, Ausführung und Evaluation klinischer Studien Phase I - IV mit gesunden Probanden und Patienten
- Klinisch-praktische Anwendungen von neuen, zellbasierten Gerinnungstesten im Rahmen von klinischen Studien

August 2002-März 2007

Wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Deutsche Klinik für Diagnostik Wiesbaden,
Fachbereich Hämostaseologie und Angiologie:

- Klinisch-praktische Anwendungen unter Routinebedingungen von zellbasierten in-vitro Gerinnungstestes in der DKD im Rahmen von Patienten und Probandenstudien im Industrieauftrag
- Studien-Kooperationen mit der Uniklinik Frankfurt am Main (Hämophiliezentrum, Zentrum der Kinderheilkunde, Orthopädische

Universitätsklinik – Stiftung Friedrichsheim, Pharmazentrum) sowie dem Paul-Ehrlich-Institut (PEI) in Langen, der Universitätsklinik Leipzig (Einheit für multidisziplinäre Intensivmedizin) und dem Herzzentrum Leipzig GmbH

- Betreuung im hämostaseologischen Kurs im Rahmen des Studentenpraktikums klinische Chemie am Klinikum der Universitätsklinik Frankfurt am Main

Januar 2008-

Wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Paul-Ehrlich-Institut Langen,
Fachbereich 7/1 Gerinnungsprodukte 1:

- Koordination der Verfahren für nationale Zulassungs- und Änderungsanträge nach dem AMG

BERUFLICHE WEITERBILDUNGEN und -QUALIFIZIERUNGEN

Februar 2000

Prüfarztkurs, Koordinierungszentrum für Klinische Studien (KKS) der Universität Mainz, Fachbereich Medizin

März 2000

Univariate Statistische Auswertungsstrategien, KKS der Universität Mainz, Fachbereich Medizin

November 2000

Fallzahlplanung in Klinischen Studien, KKS der Universität Mainz, Fachbereich Medizin

Mai 2001

Erstellung GCP-konformer Prüfpläne und Anträge an Ethikkommissionen, KKS der Universität Mainz, Fachbereich Medizin

Stand: 20. März 2008

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Entwicklung und Anwendung eines Testes zum klinischen Monitoring einer Therapie mit rFVIIa bei thrombozytären Gerinnungsstörungen“

in der

Deutschen Klinik für Diagnostik, Wiesbaden
Fachbereich Hämostaseologie

unter Betreuung und Anleitung von

Herrn PD Dr. Carl M. Kirchmaier

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde teilweise in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

- Wegert W, Harder S, Bassus S, Kirchmaier CM.
Platelet-dependent thrombin generation assay for monitoring the efficacy of recombinant Factor VIIa.
Platelets 2005 Feb;16(1):45-50

Frankfurt, den 08.07.2009

Wolfgang Wegert